

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN  
ÜBER DIE INAKTIVIERUNG  
VON REOVIRUS, SEROTYP 1,  
UNTER ERHALT DER IMMUNISIERENDEN  
EIGENSCHAFTEN**

Telmo Vidor

1973





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554606\\_0041](https://archive.org/details/IA41554606_0041)



Aus dem Institut für Mikrobiologie und  
Infektionskrankheiten der Tiere  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

---

Vergleichende Untersuchungen über die Inaktivierung  
von Reovirus, Serotyp 1,  
unter Erhalt der immunisierenden Eigenschaften

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Telmo Vidor  
aus  
Osório/Rio Grande do Sul  
Brasilien

München 1973



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen  
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof.Dr.Erwin Dahme

Referent: Prof.Dr.Dr.h.c.Anton Mayr

Korreferent: Prof.Dr.Joachim von Sandersleben

Tag der Promotion: 27. Juli 1973

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                 | Seite |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| 1. E I N L E I T U N G<br>=====                                 | -1-   |
| 2. S C H R I F T T U M<br>=====                                 | -2-   |
| 2.1 GRUNDLAGEN DER VIRUSINAKTIVIERUNG<br>=====                  | -2-   |
| 2.1.1 Begriffsbestimmung                                        | -2-   |
| 2.1.2 Reaktionsparameter bei der Inaktivierung                  | -2-   |
| 2.1.3 Verlaufsformen bei der Inaktivierung                      | -6-   |
| 2.2 INAKTIVIERUNG VON VIREN DURCH CHEMISCHE MITTEL<br>=====     | -9-   |
| 2.2.1 Allgemeines                                               | -9-   |
| 2.2.2 Inaktivierung durch Formalin                              | -9-   |
| 2.2.3 Inaktivierung durch $\beta$ -Propiolacton                 | -13-  |
| 2.2.4 Inaktivierung durch Äthyläthylenimin                      | -15-  |
| 2.2.5 Inaktivierung durch Acethyläthylenimin                    | -15-  |
| 2.2.6 Inaktivierung durch Hydroxylamin                          | -16-  |
| 2.2.7 Inaktivierung durch salpetrige Säure                      | -17-  |
| 2.3 INAKTIVIERUNG VON VIREN DURCH PHYSIKALISCHE MITTEL<br>===== | -21-  |
| 2.3.1 Inaktivierung durch Wärme                                 | -21-  |
| 2.3.2 Inaktivierung durch ultraviolette Strahlung               | -22-  |
| 2.4 INAKTIVIERUNG VON REOVIREN<br>=====                         | -24-  |
| 2.4.1 Inaktivierung durch chemische Mittel                      | -24-  |
| 2.4.2 Inaktivierung durch Wärme                                 | -24-  |
| 2.4.3 Inaktivierung durch ultraviolette Strahlung               | -25-  |
| 2.5 IMPFSTOFF GEGEN REOVIRUS-INFEKTIONEN<br>=====               | -26-  |
| 2.6 ANTIKÖRPER UND IMMUNITÄT GEGEN DIE REOVIRUS-<br>=====       |       |
| INFEKTION<br>=====                                              | -27-  |
| 2.6.1 Allgemeines                                               | -27-  |

|       |                                                                                                           |      |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.6.2 | Antikörper und Immunität beim Rind                                                                        | -29- |
| 2.6.3 | Bildung von Reovirus-Antikörpern in der Maus                                                              | -30- |
| 2.6.4 | Antikörper und Immunität beim Rind nach Impfung mit Reovirus Serotyp 1 - Vakzine                          | -30- |
| 3.    | E I G E N E   U N T E R S U C H U N G E N<br>=====                                                        | -31- |
| 3.1   | MATERIAL UND METHODEN<br>=====                                                                            | -31- |
| 3.1.1 | Zellkulturen                                                                                              | -31- |
| 3.1.2 | Virusstamm                                                                                                | -31- |
| 3.1.3 | Viruszüchtung und Gewinnung des Virusmaterials                                                            | -32- |
| 3.1.4 | Virustitrationen                                                                                          | -32- |
|       | 3.1.4.1 Titration der Infektiosität                                                                       | -32- |
|       | 3.1.4.2 Titration des Hämagglutinins                                                                      | -32- |
| 3.1.5 | Virusinaktivierung                                                                                        | -33- |
|       | 3.1.5.1 Inaktivierung durch Hitze                                                                         | -33- |
|       | 3.1.5.2 Inaktivierung durch Formalin                                                                      | -33- |
|       | 3.1.5.3 Kontrolle der völligen Inaktivierung des Reovirus                                                 | -34- |
| 3.1.6 | Versuchsimpfstoffe                                                                                        | -34- |
| 3.1.7 | Versuchstiere, Impfschema und Serumgewinnung                                                              | -35- |
| 3.1.8 | Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegenüber Reovirus Serotyp 1 in Mäuseseren                         | -35- |
|       | 3.1.8.1 Hämagglutinationshemmungstest                                                                     | -36- |
|       | 3.1.8.1.1 Vorbehandlung der Seren                                                                         | -36- |
|       | 3.1.8.1.2 Hauptversuch                                                                                    | -37- |
|       | 3.1.8.2 Neutralisationstest                                                                               | -37- |
| 3.2   | VERSUCHE UND ERGEBNISSE<br>=====                                                                          | -38- |
| 3.2.1 | Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 durch Hitze                                                          | -38- |
| 3.2.2 | Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 durch Formalin                                                       | -40- |
| 3.2.3 | Untersuchungen von Seren ungeimpfter Kontrollmäuse auf das Vorkommen von Reovirus Serotyp 1 - Antikörpern | -42- |
| 3.2.4 | Bildung von humoralen Antikörpern in Mäusen nach Impfung mit inaktiviertem Reovirus Serotyp 1             | -43- |

|                                                                                | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2.4.1 Impfung mit hitzeinaktiviertem Virus                                   | -43-  |
| 3.2.4.2 Impfung mit formalininaktiviertem Virus                                | -43-  |
| 3.2.4.2.1 Allgemeines                                                          | -43-  |
| 3.2.4.2.2 Bildung hämagglutinations-<br>hemmender Serumantikörper<br>in Mäusen | -44-  |
| 3.2.4.2.3 Bildung neutralisierender<br>Serumantikörper in Mäusen               | -45-  |
| 4.       B E S P R E C H U N G   D E R   E R G E B N I S S E                   | -47-  |
| =====                                                                          |       |
| 5.       Z U S A M M E N F A S S U N G                                         | -51-  |
| =====                                                                          |       |
| 6.       L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S                               | -53-  |
| =====                                                                          |       |



1.        E I N L E I T U N G  
=====

Bei der Intensivhaltung von Rindern gewinnen infektiöse Faktoren-  
erkrankungen immer mehr an Bedeutung.

Neuere Forschungsergebnisse aus dem In- und Ausland haben  
ergeben, daß an solchen Faktorenerkrankungen auch Reoviren  
mitbeteiligt sein können. Von den drei beim Rind vorkommenden  
Reovirus-Serotypen spielt in unserem Lande der Serotyp 1 die  
größte Rolle.

Da bei der Intensivhaltung der Rinder die Immunprophylaxe  
eine immer größere Bedeutung erlangt, steht auch eine Immuni-  
sierung gegen Reovirus-Infektionen zur Diskussion.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, einige Grundlagen für die  
Entwicklung eines derartigen Impfstoffes auf der Basis eines  
inaktivierten Virus zu erarbeiten.

Fragen nach einem geeigneten Inaktivierungsverfahren standen  
deshalb zunächst im Vordergrund. Daneben wurde versucht,  
für spätere Wirksamkeitsprüfungen von Reovirus-Impfstoffen  
ein geeignetes und wirtschaftliches Verfahren zu finden.

## 2. S C H R I F T T U M =====

### 2.1 GRUNDLAGEN DER VIRUSINAKTIVIERUNG =====

#### 2.1.1 Begriffsbestimmung =====

Unter einer Inaktivierung von Viren versteht man einen Vorgang, bei dem einem kompletten Virus (Virion) auf natürliche oder künstliche Weise die Vermehrungsfähigkeit durch chemische und/oder physikalische Einwirkungen genommen wird, ohne daß dadurch seine anderen biologischen Aktivitäten, insbesondere seine immunisierenden Eigenschaften, beeinflußt werden.

#### 2.1.2 Reaktionsparameter bei der Inaktivierung =====

Art und Verlauf einer Virusinaktivierung sind von folgenden Parametern abhängig:

- a) Art des Inaktivierungsmittels,
- b) Konzentration des Inaktivierungsmittels,
- c) Reaktionstemperatur,
- d) Einwirkungszeit des Inaktivierungsmittels, und
- e) Art des Reaktionsmilieus, besonders pH-Wert, Viskosität usw.

Der Einfluß der einzelnen Parameter steht in enger Beziehung zu den chemisch-physikalischen Eigenschaften des zu inaktivierenden Virus. Grundsätzlich gilt aber, daß sich mit zunehmender Konzentration des Inaktivierungsmittels und steigender Reaktionstemperatur die Inaktivierungszeit verkürzt. Dagegen ist der für die Inaktivierung günstigste pH-Wert des Reaktionsmilieus sowohl vom Inaktivierungsmittel als auch von der zu inaktivierenden Virusart abhängig.

Die Abhängigkeit des Inaktivierungsverlaufes von der Veränderung der einzelnen Reaktionsparameter zeigt sich an folgenden typischen Beispielen.

Die Beziehung zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Konzentration des Inaktivierungsmittels ist aus der Abbildung 1 zu ersehen. LYCKE (1958) wies am Beispiel der Formalininaktivierung des Poliovirus nach, daß die Geschwindigkeit der Inaktivierung proportional mit zunehmender Formalinkonzentration steigt.

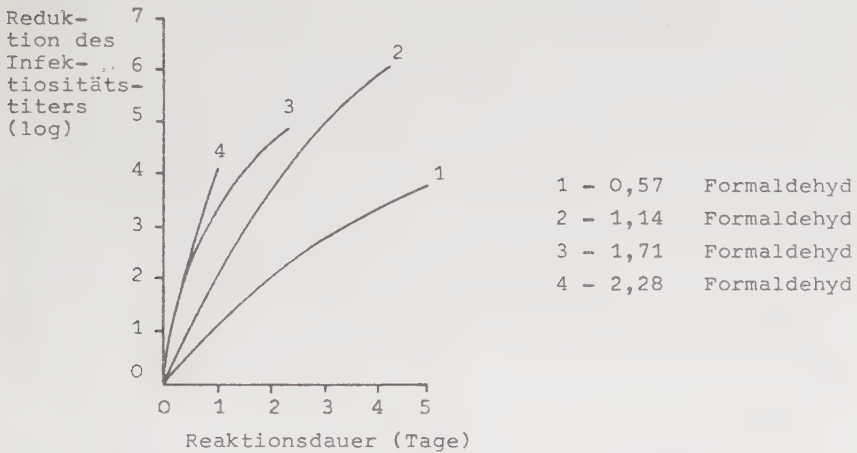


Abbildung 1: Inaktivierung von Poliomyelitisvirus bei 25° C, pH 7,0 durch Formalin (nach LYCKE, 1958)

Zu gleichsinnigen Ergebnissen kam man bei der Inaktivierung von

- Teschenvirus mit Formalin (MAYR 1958),
- Newcastle disease-Virus mit Formalin und  $\beta$ -Propiolacton (UBERTINI, NARDELI und CESSI 1957),
- Maul- und Klauenseuche-Virus mit Formalin (WESSLÉN und DINTER 1957),
- Maul- und Klauenseuche-Virus mit  $\beta$ -Propiolacton (UBERTINI, NARDELI und CESSI 1957), sowie
- Mäuseenzephalitisvirus, Pferdeenzephalitisvirus und Tollwutvirus mit  $\beta$ -Propiolacton (LO GRIPPO und HARTMANN 1955)

Die Reaktionstemperatur bei der Inaktivierung ist ebenfalls von großer Bedeutung. Bei höherer Temperatur läuft die Inaktivierung schneller ab als bei niedrigerer. Besonders deutlich macht sich dies bei stark temperaturempfindlichen Virusarten, z.B. beim Maul- und Klauenseuche-Virus bemerkbar: dieses Virus wird z.B. bei 36° C und einer Formalinkonzentration von 1:4000 schneller inaktiviert als bei doppelter Formalinkonzentration und einer Temperatur von 25° C (siehe Abbildung 2).

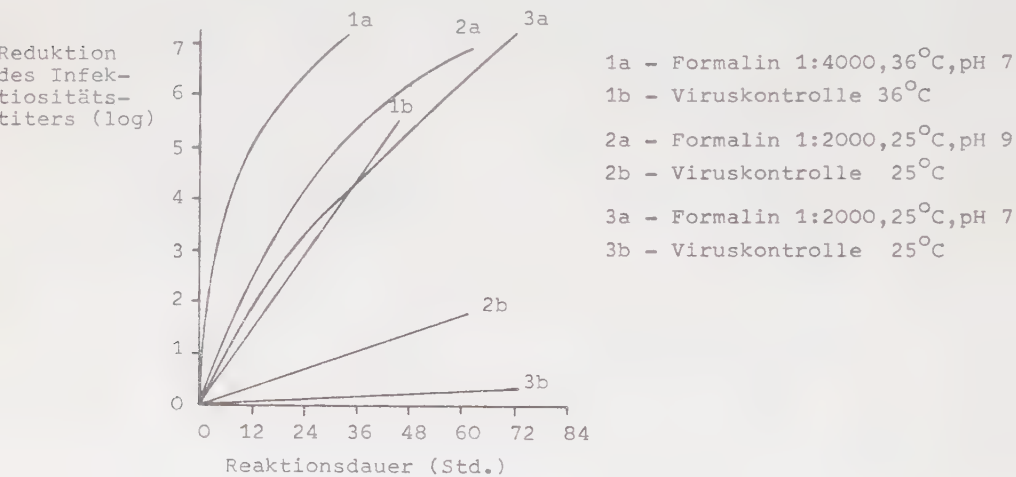


Abbildung 2: Inaktivierung von Maul- und Klauenseuche-Virus bei unterschiedlicher Temperatur und Formalinkonzentration (nach WESSLEN und DINTER, 1957, modifiziert)

Zu entsprechenden Ergebnissen kamen FELLOWES (1966) bei der Inaktivierung von Maul- und Klauenseuche-Virus mit Hydroxylamin sowie LYCKE (1958) bei der Inaktivierung von Poliomyelitisvirus mit Formalin.

Der Einfluß der Ionenkonzentration bei der Virusinaktivierung ist abhängig von der pH-Empfindlichkeit des jeweiligen Virus. So läuft z.B. die Inaktivierung des Poliomyelitisvirus bei einem pH-Wert von 8,8 schneller ab als bei pH 7,2 und 7,8 (LYCKE 1958) (siehe Abbildung 3).

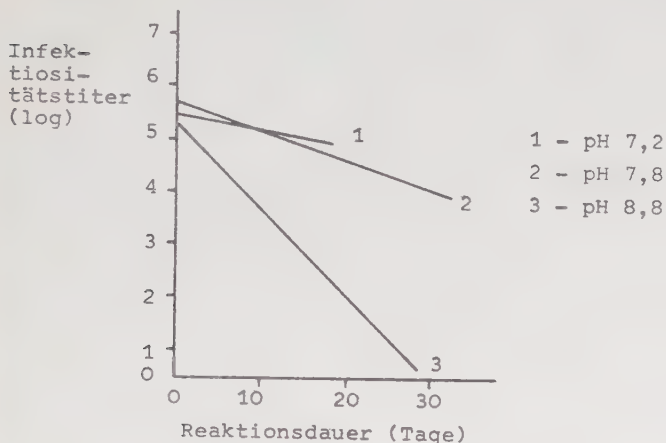


Abbildung 3: Inaktivierung von Poliomyelitisvirus bei 25° C und verschiedenen pH-Werten (nach LYCKE 1958)

Entsprechende Verhältnisse findet man bei der Formalininaktivierung von Maul- und Klauenseuche-Virus (WESSLÉN und DINTER 1957) (siehe Abbildung 2). Dieses Virus ist außerdem gegenüber niedrigen pH-Werten sehr empfindlich: bei einem pH-Wert von 5,0 kommt es innerhalb 2 Minuten zur fast völligen Inaktivierung des Virus (WITTMANN 1967).

Der Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich wird außerdem eine mutagene Wirkung zugeschrieben, so z.B. bei der Inaktivierung des Tabakmosaikvirus mit Hydroxylamin (SCHUSTER und SCHRANN 1956, GIERER und MUNDY 1958, BROWN und SCHILL 1960, SCHUSTER 1961, SCHUSTER und WITTMANN 1963).

### 2.1.3 Verlaufsformen bei der Inaktivierung

=====

Bei der Virusinaktivierung unterscheidet man 2 mögliche Verlaufsformen:

- a) Reaktion 1. Ordnung (monophasische Inaktivierung), und
- b) Reaktion 2. Ordnung (biphasische Inaktivierung).

Bei der Reaktion 1. Ordnung verhält sich die Inaktivierungsgeschwindigkeit direkt proportional zur Konzentration des Inaktivierungsmittels (HIOTT 1964). Voraussetzung für einen derartigen Inaktivierungsverlauf ist die gleichmäßige Empfindlichkeit aller in einer Viruspopulation vorhandenen infektiösen Einheiten gegenüber dem verwendeten Inaktivierungsmittel.

Die graphische Darstellung einer Reaktion 1. Ordnung, wobei Ordinate und Abszisse eines Koordinatenkreuzes als Bezugspunkte für Restinfektiositätstiter bzw. Infektiositätstiterverlust (log) und für Inaktivierungsdauer gelten, ergibt eine Gerade. Der Inaktivierungsverlauf nach einer Reaktion 1. Ordnung wurde von einigen Autoren mathematisch erfaßt.

So verläuft z.B. nach GARD (1956) die Formalininaktivierung des Poliomyelitisvirus nach der Formel

$$\log y_0 - \log y = a \cdot \log (1+bt),$$

wobei bedeuten:

$y_0$  = Infektiositätstiter der Virussuspension vor Beginn der Inaktivierung,

$y$  = Restinfektiositätstiter der Virussuspension,

$t$  = Inaktivierungsdauer

$a, b$  = konstante, virusart- und virusstammspezifische Parameter.

Für die Inaktivierung des MKS-Virus durch ultraviolette Bestrahlung gilt nach STROHMAIER und GEISS (1960) die Formel

$$J(x) = J_1 \cdot e^{-ax} + J_2 \cdot e^{-bx} ;$$

hier bedeuten:

$x$  = Strahlendosis

$J(x)$  = Anzahl der infektiösen Einheiten nach Bestrahlung mit der Dosis  $x$ ,

$J_1, J_2, a, b$  = stammspezifische Konstanten.

Eine ähnliche Formel entwickelte WOESE (1960) für die Temperaturinaktivierung des Maul- und Klauenseuche-Virus:

$$y = K_1 \cdot e^{-c_1 t} + K_2 \cdot e^{-c_2 t} ,$$

wobei bedeuten:

y = Restinfektiosität der Virussuspension

t = Inaktivierungsdauer

K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>: Konstanten, abhängig von der Passagenzahl des Virusstammes.

Bei der Virusinaktivierung nach einer Reaktion 2. Ordnung lassen sich 2 Phasen unterscheiden: der ersten, wie eine Reaktion 1. Ordnung ablaufenden Phase folgt eine zweite, die gegen Ende der Inaktivierung durch eine relativ langsamere Inaktivierung des Virusmaterials charakterisiert ist, d.h. bei diesem Reaktionsablauf biegt die zuerst nach einer Reaktion 1. Ordnung verlaufende Inaktivierungskurve unten asymptotisch um und verläuft ins Unendliche.

Bei graphischer Darstellung erhält die Inaktivierungskurve eine asymptotische Form.

Typische Beispiele für eine Reaktion 2. Ordnung sind die Thermoinaktivierungskurven beim Teschenvirus (MAYR, STROHMAIER und LORENZ 1961) (siehe Abbildung 4) und Maul- und Klauenseuche-Virus (WITTMANN 1967).

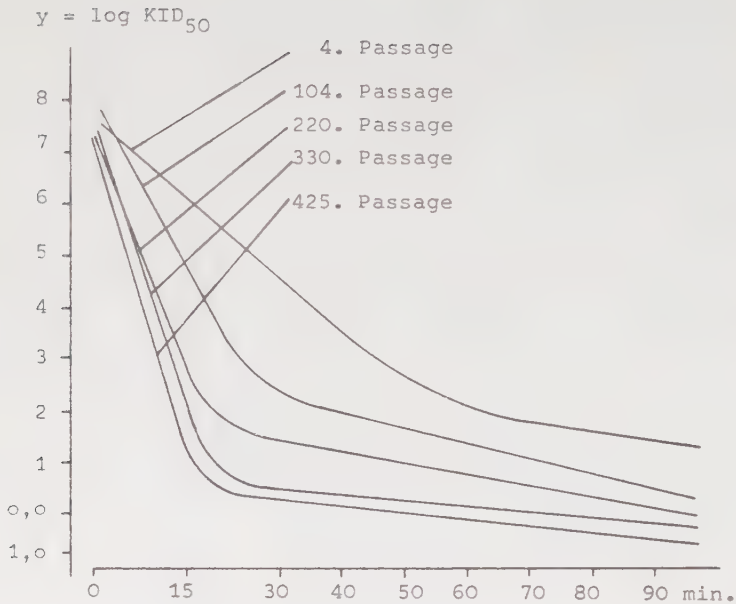


Abbildung 4: Veränderung der Thermoresistenz ( $56^{\circ}\text{C}$ ) des Teschenvirusstammes Konratice durch Dauerpassagen in Schweinenierenkulturen (nach MAYR, STROHMAIER und LORENZ 1961)

Als Ursachen für einen derartigen Inaktivierungsablauf kommen in Betracht:

- a) Ablauf des Inaktivierungsvorganges als Komplex mehrerer Einzelprozesse (MAYR, STROHMAIER und LORENZ 1961),
- b) Heterogenität der Viruspopulation hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Inaktivierungsmittel (SIEGEL 1960, PAPAEOVANGELOU und YOUNGNER 1961, SCHUSTER und WITTMANN 1963),
- c) Existenz von Virusaggregaten, und
- d) Verunreinigung der Virussuspension mit Fremdprotein (HAAS, THOMSEN, DOSTAL und RUSCHMANN 1960, WITTMANN 1967).

## 2.2 INAKTIVIERUNG VON VIREN DURCH CHEMISCHE MITTEL =====

### 2.2.1 Allgemeines =====

Die Inaktivierung von Viren durch chemische Mittel kann auf dreierlei Weise erfolgen:

- a) durch Einwirkung des Inaktivierungsmittels auf die Virusnukleinsäure unter Erhalt der Struktur des Virions,
- b) durch Einwirkung des Inaktivierungsmittels auf das Virusprotein unter Erhalt der Struktur des Virions, und
- c) durch Einwirkung des Inaktivierungsmittels auf die Hüllstruktur bei behüllten Viren unter Erhalt der Struktur des Virions.

Auf die Nukleinsäuren bzw. Proteine wirken Inaktivierungsmittel wie Formalin,  $\beta$ -Propiolacton, Äthyläthylenimin, Acethyläthylenimin, Hydroxylamin und salpetrige Säure.

### 2.2.2 Inaktivierung durch Formalin =====

Das Formalin ist in der Geschichte der Impfstoffherstellung eines der bekanntesten Inaktivierungsmittel.

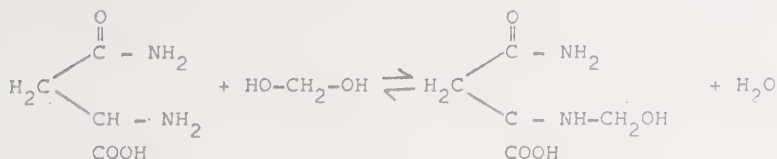
Seine Wirkung auf das Virus beschreiben LEVY und SILBERMANN (1937) folgendermaßen:

In einer ersten, schnell ablaufenden Stufe reagiert das Formalin mit der Aminogruppe des Asparagins unter Bildung einer Monomethylol-Verbindung. Die dabei entstehende Aminomethylol-Verbindung wirkt so lange inaktivierend, bis sie durch den Ringschluß mit der Carbonamidgruppe verbraucht ist (2. Stufe).

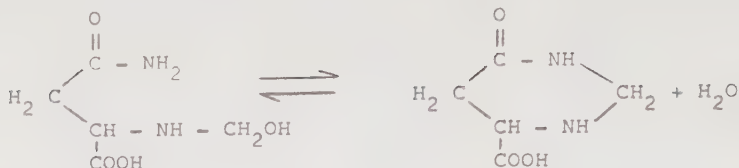
Die 2. Reaktionsstufe verläuft langsamer als die erste.

Die Autoren geben folgende Reaktionsformel an:

1. Reaktionsstufe:



## 2. Reaktionsstufe:



Untersuchungen von HEIKEN (1962) sowie FRAENKEL-CONRAT (1948) bestätigen diesen Reaktionsablauf.

FRAENKEL-CONRAT (1954), CARTWRIGHT (1956) und STAEHLIN (1959, 1960) verweisen auf Grund ihrer Untersuchungen am Tabakmosaikvirus außerdem auf chemische Reaktionen des Formalins mit den Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäure.

Die komplexe Wirkung des Formalins auf das Virus führt gewöhnlich zu einer Inaktivierungsreaktion 2. Ordnung (WESSLÉN 1956, 1957; SCHULTZ 1957; GARD und LYCKE 1957; WITTMANN 1972).

Auf die Möglichkeit dieser Reaktivierung der durch Formalin inaktivierten Viren verweisen FRAENKEL-CONRAT (1954), HEIKEN (1956), HAAS, THOMSEN, DOSTAL und RUSCHMANN (1960) sowie HEIKEN und SPICHER (1962).

Zur Reaktivierung kommt es insbesondere nach Kurzzeit-Inaktivierung und bei einem Überschuß an Asparagin, Tryptophan oder Histidin. Derartige Reaktivierungen wurden experimentell am Modell von Coliphagen nachgewiesen.

Die bei der Herstellung von Impfstoffen zur Virusinaktivierung benützten Formalinkonzentrationen sind bei den einzelnen Virusarten unterschiedlich. Sie betragen 0,01 - 0,5 %. Große Unterschiede finden sich auch bei den Reaktionstemperaturen (4° - 37° C) und der Inaktivierungsdauer (30 Minuten bis zu 8 Tage). Grundsätzlich gilt aber, daß mit höherer Formalinkonzentration bzw. ~~Reaktionstemperatur~~ die Inaktivierungsgeschwindigkeit zunimmt.

Eine Übersicht über die bei der Virusinaktivierung mit Formalin gebräuchlichsten Parameter vermittelt die Tabelle 1.

Tabelle 1: Reaktionsparameter bei der Inaktivierung von  
 =====  
 Virusarten mit Formalin

| Virusart                       | Inaktivierungsmethode |                       |                      | Literatur                                                                                |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | Formalin-konz. (%)    | Temperatur<br>pH-Wert | Inaktivie-rungsdauer |                                                                                          |
| BAV-3                          | 0,01                  | 37° C                 | 4 Tage               | Tribe (1969)                                                                             |
| BVD-MD                         | 0,4                   | 4° C                  | 7 Tage               | Kolar (1972)                                                                             |
| Influenza                      | 0,01                  | 37° C                 | 30 Min.              | Csonka (1962)                                                                            |
|                                | 0,05                  | 4° C                  | 48 Std.              | Furminger (1969),<br>Francis and Salk (1942)                                             |
| Marek                          | 0,1                   | 37° C                 | 1 Std.               | Toth (1971)                                                                              |
| Mäuseenze-<br>phalitis         | 0,5                   | 37° C                 | 48 Std.              | Lo Grippo (1955)                                                                         |
| Maul- und<br>Klauen-<br>seuche | 0,05                  | 25°C, pH 9,0          | 24 Std.              | Waldmann (1938),<br>Frenkel (1951),<br>Hyslop (1969),<br>Morrow (1966),<br>Graves (1963) |
|                                | 0,05                  | 25°C, pH 7,0          | 72 Std.              | Wesslén (1957)                                                                           |
|                                | 0,025                 | 36°C, pH 7,0          | 48 Std.              | Wesslén (1957)                                                                           |
|                                | 0,1                   | 25° C                 | 48 Std.              | Ubertini (1957),<br>Graves (1963)                                                        |
|                                | 0,02                  | 25° C                 | 48 Std.              | Rowlands (1972)                                                                          |
|                                | 0,04                  | 25° C                 | 24 Std.              | Rowlands (1972)                                                                          |
| Newcastle                      | 0,025                 | 4° C                  | 8 Tage               | Siegmann (1965)                                                                          |
|                                | 0,025-0,5             | 37° C                 | 2 Std.               | Ubertini (1957)                                                                          |
|                                | 0,1                   | 4° C                  | 48 Std.              | Appleton (1963)                                                                          |
|                                | 0,5                   | 4°C, pH 7,4           | 6 Tage               | Traub (1943)                                                                             |
| Parainflu-<br>enza 3           | 0,025                 | 37°C, pH 6,8          | 48 Std.              | McClelland (1961)                                                                        |
|                                | 0,4                   | 4°C, pH 6,8           | 7 Tage               | Kolar (1972)                                                                             |
|                                | 0,5                   | 37° C                 | 48 Std.              | King (1963)                                                                              |

Tabelle 1: (Fortsetzung)

| Virusart                          | Inaktivierungsmethode        |                       |                          | Literatur                                                           |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                                   | Inaktivierungs-<br>konz. (%) | Temperatur<br>pH-Wert | Inaktivie-<br>rungsdauer |                                                                     |
| Pferdeherpes-<br>pharinx<br>(FHF) | 0,05                         | 37°C                  | 16-48 Std.               | Cole (1971),<br>Lo Grippo (1955)                                    |
|                                   | 0,1                          | 37°C                  | 8 Std.                   | White (1971)                                                        |
| (VZV)                             | 0,3                          | 24°C                  | 24 Std.                  | Mussgay (1972)                                                      |
| Polio-<br>myelitis                | 0,025                        | 37°C, pH 7,0          | 5 - 7 Tage               | Salk (1957), Hull (1958)                                            |
|                                   | 0,02                         | 37°C, pH 7,0          | 75 Std.                  | Haas (1957),<br>Brown (1963)                                        |
|                                   | 0,05                         | 25°C, pH 7,0          | 6 - 7 Tage               | Gard (1955),<br>Wesslén (1957),<br>Lycke (1958),<br>Böttiger (1958) |
| Teschien                          | 0,02                         | 37°C, pH 7,3          | 72 Std.                  | Mayr (1958)                                                         |
|                                   | 0,04                         | 37°C, pH 7,3          | 48 Std.                  | Mayr (1958)                                                         |
|                                   | 0,1                          | 25°C, pH 7,3          | 48 Std.                  | Traub (1941)                                                        |
|                                   | 0,1                          | 4°C, pH 7,3           | 4 Tage                   | Traub (1941)                                                        |
| Rinderpest                        | 0,1                          | 37°C                  | 8 Tage                   | Backer (1946)                                                       |
| Tollwut                           | 0,3                          | 37°C                  | 48 Std.                  | Lo Grippo (1955)                                                    |

### 2.2.3 Inaktivierung durch $\beta$ -Propiolacton

=====

Das  $\beta$ -Propiolacton (Hydracrylsäure- $\beta$ -lacton,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) wurde wegen seiner bakteriziden, fungiziden und viruziden Wirkung zunächst als Konservierungsmittel für Blutkonserven bekannt (HARTMAN 1951, HARTMAN, PIEPES und WALLBANK 1951, BERNHEIM 1952, KELLY 1952, KELLY und HARTMAN 1952).

Seine inaktivierende Wirkung auf Viren beruht auf Reaktionen mit Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl- und Phenolgruppen der Nukleoproteine (GRESHAM, JANSEN, SHAVER und GREGORY 1948, 1952).

Als Vorteile des  $\beta$ -Propiolactons gegenüber anderen Inaktivierungsmitteln führen LO GRIPPO und HARTMAN (1955) am Beispiel des Pferdeenzephalitisvirus, Mäuseenzephalitisvirus und Tollwutvirus an:

- a) die Virusinaktivierung erfolgt rascher und ist irreversibel,
- b) die Grenzwerte zwischen minimal notwendiger Dosis und der die immunogenen Eigenschaften des Virus beeinträchtigenden Dosis sind relativ groß.

Ein weiterer Vorteil des  $\beta$ -Propiolactons liegt in seiner geringen Stabilität: in wässriger Lösung zerfällt es in Beta-hydroxypropionsäure und - bei Vorhandensein von Chlorionen - Betachlorpropionsäure. Beide Säuren wirken, abgesehen von der reinen Säurewirkung auf säurelabile Virusarten, nicht viruzid (LO GRIPPO 1955). Überschüssiges  $\beta$ -Propiolacton oder dessen Zerfallsprodukte erfordern deshalb in inaktivierten Virus-suspensionen keine Neutralisierung. Eine Justierung des pH-Wertes bei der Inaktivierung ist jedoch wegen der durch die Zerfallsprodukte des  $\beta$ -Propiolactons bedingten Säuerung des Reaktionsmilieus notwendig.

Literaturangaben über die für die Inaktivierung erforderliche  $\beta$ -Propiolacton-Endkonzentration variieren zwischen 0,016 % und 0,5 %. Selbst für einzelne Virusarten findet man unterschiedliche Daten. Die Reaktionstemperatur liegt zwischen  $+4^\circ$  und  $+37^\circ$ , die Reaktionsdauer ist im allgemeinen relativ kurz (20 Minuten bis 4 Tage).

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Literaturangaben über Reaktionsparameter bei der Virusinaktivierung mit  $\beta$ -Propiolacton vermittelt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Reaktionsparameter bei der Inaktivierung von  
Virusarten durch  $\beta$ -Propiolacton

| Virusart                              | Inaktivierungsmethode |                           |                          | Literatur                       |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
|                                       | BPL-konz. (%)         | Reaktionstemp.<br>pH-Wert | Inaktivierungs-<br>dauer |                                 |
| Aviäre Enzeph.                        | 0,2                   | 37°C                      | 2 Std.                   | Macleod (1965)                  |
| BVD-MD                                | 0,2                   | 25°C, pH 8,0              | 20 Min.                  | Fernelius (1972)                |
| Influenza                             | 0,1                   | 37°C                      | 2 Std.                   | Furminger (1969)                |
|                                       | 0,1                   | 4°C                       | 24 Std.                  | Furminger (1969)                |
| MKS                                   | 0,05                  | 37°C                      | 2 Std.                   | Ubertini (1955)                 |
| Mäuseenkephalitis                     | 0,05-0,3              | 37°C                      | 2 Std.                   | Lo Grippo (1955)                |
| Newcastle                             | 0,025                 | 37°C                      | 2 Std.                   | Mack (1955)                     |
|                                       | 0,2                   | 37°C                      | 2 Std.                   | Zichriya (1971)                 |
|                                       | 0,2                   | 4°C                       | 48 Std.                  | Appleton (1963)                 |
|                                       | 0,05                  | 4°C                       | 48 Std.                  | Appleton (1963)                 |
|                                       | 0,1                   | 70°F                      | 2 Std.                   | Sullivan (1958),<br>Gill (1959) |
| Pferde-<br>enzepha-<br>litis<br>(EEE) | 0,05                  | 37°C                      | 2 Std.                   | Lo Grippo (1955)                |
| (VEE)                                 | 0,1                   | 4°C                       | 4 Tage                   | French (1964)                   |
| (VEE)                                 | 0,12                  | 4°C                       | 4 Tage                   | French (1964)                   |
| (VEE)                                 | 0,2                   | 4°C                       | 4 Tage                   | French (1964)                   |
| Tollwut                               | 0,05                  | 37°C, pH 7,2              | 2 Std.                   | Lo Grippo (1955)                |
|                                       | 0,1                   | 4°C                       | 24 Std.                  | Wiktor (1964)                   |
|                                       | 0,15                  | 4°C                       | 2 Std.                   | Wiktor (1969)                   |
|                                       | 0,2                   | 37°C                      | 48 Std.                  | Wiktor (1964)                   |

#### 2.2.4      Inaktivierung durch Äthyläthylenimin =====

Die inaktivierende Wirkung des Äthyläthylenimins (EEI) ( $\text{NHCH}_2\text{CHC}_2\text{H}_5$ ) beruht auf seiner Reaktion mit der Virusnukleinsäure. Eine gleichzeitige Wirkung auf das Virusprotein beeinträchtigt die immunogenen Eigenschaften des Virus nicht. Die Virusinaktivierung verläuft als Reaktion 1. Ordnung.

BAUER (1970) inaktivierte Maul- und Klauenseuche-Virus, Typ  $\text{O}_1$ , bei  $37^\circ\text{C}$  mit EEI (0,1 %) in 6 Stunden bzw. 12 Stunden mit halber EEI-Konzentration. Die Herabsetzung der Reaktionstemperatur auf  $23^\circ\text{C}$  hatte eine deutliche Verlangsamung des Inaktivierungsvorganges zur Folge (30 Stunden bei einer EEI-Konzentration von 0,05 %).

WITTMANN, BAUER und MUSSGAY (1970 a, b, c, 1971, 1972) gelang die Herstellung einer gut wirksamen MKS-Vakzine des Typs  $\text{O}_1$  unter Verwendung einer EEI-Konzentration von 0,05 % und einer Inaktivierungstemperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Außerdem bewährte sich das EEI als Inaktivierungsmittel bei der Herstellung eines Impfstoffes gegen die Pferdeenzephalitis (VEE) (MUSSGAY 1973).

SKODA und WITTMANN (1972) berichten über die Inaktivierung von Aufjeszky-Virus mit EEI (Konzentration 0,15 %) bei pH 7,2 und einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  innerhalb 16 Stunden.

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Inaktivierungsverfahren mit EEI vermittelt die Tabelle 3.

#### 2.2.5      Inaktivierung durch Acethyläthylenimin =====

Das Acethyläthylenimin (AEI) gehört wie das EEI in die Gruppe der Äthylenimine. Es hat gegenüber dem EEI den Nachteil der geringeren Stabilität (GRAVES und ARLINHAUS 1967).

Die Virusinaktivierung mit AEI verläuft als Reaktion 1. Ordnung. BROWN, CARTWRIGHT und STEWART (1963), FELLOWES (1965) und BAUER (1970) bewiesen dies am Modell des Maul- und Klauenseuche-Virus. Sie arbeiteten dabei mit einer AEI-Konzentration

von 0,05 % bei 37° C und einem pH-Wert von 7,6. Nach BAUER kommt es bei solchen Reaktionsparametern zur Virusinaktivierung innerhalb 6 Stunden.

ROWLANDS, SANGAR und BROWN (1972) untersuchten MKS-Vakzinen, die mit Formalin (0,05 %, 20°C, 72 Stunden) und AEI (0,05 %, 37°C, 6 Stunden) hergestellt worden waren, vergleichend auf ihre immunisierende Wirksamkeit. Bei einem von zwei SAT<sub>2</sub>-Virusstämmen (Kenia 3/57) fand er keine Unterschiede, während bei dem 2. Stamm (Kenia 227/66) der Formalin-Impfstoff die Bildung von Antikörpern besser stimulierte.

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Inaktivierungsverfahren mit AEI vermittelt die Tabelle 3.

#### 2.2.6 Inaktivierung durch Hydroxylamin =====

Bei der Inaktivierung von Viren durch Hydroxylamin (NH<sub>2</sub>OH) kommt es zu einer Reaktion 1. Ordnung. Dies zeigten SCHÄFER und ROTT (1962) am Modell des Mäuseenzephalitisvirus und Influenzavirus unter Anwendung verschiedener Versuchsparameter (Hydroxylamin-Konzentration und pH-Wert).

Inaktivierungsversuche mit Maul- und Klauenseuche-Virus (FELLOWES 1966), Poliomyelitisvirus (BORGERT 1971) sowie Rinderpest- und ECBO-Virus (SINGH 1967) weisen darauf hin, daß sich die Inaktivierungsdauer proportional der steigenden Hydroxylamin-Konzentration verkürzt.

Mehrere Autoren berichten über Inaktivierungsversuche beim Newcastle disease-Virus mit Hydroxylamin. Die dabei erzielten Ergebnisse waren sehr unterschiedlich.

Nach SCHÄFER und ROTT (1962) sowie REDA und AHMED (1967) reicht eine Hydroxylamin-Endkonzentration von 0,2 Mol zur Inaktivierung von Newcastle disease-Virusstämmen bei einer Temperatur von 20° C und pH-Werten von 5,0 - 9,0 nicht aus.

Mit einer Endkonzentration von 1 Mol des Inaktivierungsmittels gelang ROTT und SCHÄFER (1962) zwar die Inaktivierung des

mesogenen Stammes "Beaudette", nicht dagegen die Inaktivierung des velogenen Stammes "Italia". Dagegen genügt nach NEWLIN und BUSSELL (1972) eine Hydroxylamin-Konzentration von 2 Mol, um Viren der Ortho- und Paramyxogruppen bei pH-Werten von 4,5 - 7,0 zu inaktivieren.

Diese Angaben stehen allerdings im Widerspruch zu denen von FRANKLIN und WECKER (1959), denen es nicht gelungen ist, Newcastle disease-Virus und Masernvirus mit Hydroxylamin zu inaktivieren. Die gleichen Autoren hatten jedoch Erfolg bei der Inaktivierung von Pferdeenzephalitisvirus (WEE), Mäuseenzephalitisvirus und Influenzavirus.

Der Reaktionsablauf bei der Virusinaktivierung mit Hydroxylamin ist abhängig vom pH-Wert des Reaktionsmilieus. Bei einem pH-Wert von 9,1 beruht die inaktivierende Wirkung des Hydroxylamins auf einer Zerstörung des Pyrimidinkerns des Urazils. Dagegen kommt es bei einem pH-Wert von 6,1 zu einer 2-stufigen Reaktion des Hydroxylamins mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Urazil, wobei Hydroxylaminourazil gebildet wird (SCHUSTER 1961, SCHUSTER und WITTMANN 1963). Dieser Reaktionsablauf ist nach Ansicht von SCHUSTER (1961), BRAUN (1961), SCHUSTER und WITTMANN (1963) sowie FREESE (1961 a, b) die Ursache für das Auftreten von Virusmutanten, wie sie beim Tabakmosaikvirus und bei T<sub>4</sub>-Phagen nachgewiesen wurden.

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Inaktivierungsverfahren mit Hydroxylamin vermittelt die Tabelle 3.

#### 2.2.7 Inaktivierung durch salpetrige Säure =====

Die inaktivierende Wirkung von salpetriger Säure (HNO<sub>2</sub>) auf Viren beruht in einer Desaminierung der Purinbasen Guanin, Adenin, sowie der Pyrimidinbase Cytosin, wobei es zur Bildung von Xanthin, Hypoxanthin bzw. Urazil kommt (SCHUSTER und SCHRAMM 1958, GIERER und HUNDRY 1958, VIELMELTER und SCHUSTER 1960, KNIGHT 1963). Nach SIEGEL und SOONG (1972) werden bei

der Inaktivierung von Tabakmosaikvirus mit einer  $\text{HNO}_2$ -Konzentration von 0,25 Mol. und einem pH-Wert von 4,2, durchgeführt bei Zimmertemperatur, 17 % des Adenins in Hypoxanthin, 2 % des Guanins in Xanthin und 36 % des Zytosins in Urazil umgewandelt.

Nach SCHÄFER, ZIMMERMANN und SCHUSTER (1959) verläuft die  $\text{HNO}_2$ -Inaktivierung des Tabakmosaikvirus, Poliomyelitisvirus, Influenza- und Newcastle disease-Virus als Reaktion 1. Ordnung. Untersuchungen von RESTLE, HENNESSEN und SCHÄFER (1962) am Poliomyelitisvirus weisen jedoch darauf hin, daß eine komplette Inaktivierung auch zum Verlust der immunisierenden Eigenschaften des Virus führt.

Mehrere Autoren kamen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, daß es unter dem Einfluß von  $\text{HNO}_2$  zur Bildung von Virusmutanten kommt, so z.B. beim Tabakmosaikvirus (MUNDRY 1959, SIEGEL 1960), Poliomyelitisvirus (BOEYE 1959, CARY und KOPROWSKI 1962, SHENDON 1963), Newcastle disease-Virus (GRANOFF 1961, THIRY 1963), Maul- und Klauenseuche-Virus und Aujeszký-Virus (CIACCIO 1964, IVANICOVA 1963).

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Inaktivierungsverfahren mit salpetriger Säure vermittelt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Reaktionsparameter bei der Inaktivierung von Virusarten durch Äthyläthylenimin (EEI), Acethyläthylenimin (AEI), Hydroxylamin und salpetrige Säure.

| Art des Inaktivierungsmittels | Virusart                        | Inaktivierungsmethode |                                                  | Literatur                                                           |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                               |                                 | Konzentration (%)     | Reaktions-temp., pH-Wert<br>Inaktivierungs-dauer |                                                                     |
| Äthyläthylenimin (EEI)        | Ajcszky Maul- und Klauen-seuche | 0,15                  | 37°C, pH 7,2                                     | Skoda und Wittmann (1972)                                           |
|                               |                                 | 0,05                  | 22°C                                             | Bauer (1970)                                                        |
|                               |                                 | 0,05                  | 37°C                                             | Bauer (1970), Wittmann, Bauer und Müssgay (1970a, b, c, 1971, 1972) |
|                               |                                 | 0,1                   | 37°C                                             | Bauer (1970)                                                        |
| Acethyläthylenimin (AEI)      | Maul- und Klauen-seuche         | 0,05                  | 37°C, pH 7,6                                     | Brown (1963), Fellowes (1965), Bauer (1970), Rowlands (1972)        |
|                               |                                 | 0,05                  | 23°C, pH 7,6                                     | Fellowes (1965)                                                     |
| Hydroxylamin                  | ECB0                            | 0,25 Mol.             | 37°C, pH 7,2                                     | Singh (1967)                                                        |
|                               | K.P.-Virus                      | 0,2 Mol.              | 20°C, pH 8,3                                     | Schäfer (1962)                                                      |
|                               | Influenza                       | 0,2 Mol.              | 20°C, pH 7,0                                     | Schäfer (1962)                                                      |
|                               | Mäuseenzephalitis               | 0,1 Mol.              | 20°C, pH 7,0                                     | Schäfer (1962)                                                      |
|                               |                                 | 0,5 Mol.              | 20°C, pH 7,0                                     | Schäfer (1962)                                                      |
|                               | Maul- und Klauen-seuche         | 1 Mol.                | 37°C, 33°C, 4°C, pH 7,5                          | Fellowes (1966)                                                     |
|                               |                                 | 0,5 Mol.              | 23°C, pH 7,5                                     | Fellowes (1966)                                                     |
|                               |                                 | 0,25 Mol.             | 4°C, 23°C, pH 7,5                                | Fellowes (1966)                                                     |
|                               |                                 | 0,1 Mol.              | 37°C, pH 7,5                                     | Fellowes (1966)                                                     |
|                               | Pinderpest                      | 0,25 Mol.             | 37°C, pH 7,2                                     | Singh (1967)                                                        |

Tabelle 3: (Fortsetzung)

| Art des Inaktivierungsmittels | Virusart          | Inaktivierungsmethode |                         |                     | Literatur                     |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
|                               |                   | Konzentration (%)     | Reaktionstemp., pH-Wert | Inaktivierungsdauer |                               |
| Salpetrige Säure              | Influenza         | 1 Mol.                | 20°C, pH 5,6            | 60 Min.             | Schäfer (1962)                |
|                               | Mäuseenzephalitis | 1 Mol.                | 20°C, pH 4,6            | 30 - 40 Min.        | Schäfer (1962)                |
|                               | Newcastle disease | 1 Mol.                | 20°C, pH 4,6            | 10 Min.             | Schäfer (1962)                |
|                               |                   | 1 Mol.                | 20°C, pH 5,6            | 150 Min.            | Schäfer (1962)                |
|                               | Polio-myelitis    | 0,1 Mol.              | 20°C, pH 4,6            | 7 Std.              | Restle (1962)                 |
|                               |                   | 0,1 Mol.              | 20°C, pH 5,0            | 16 Std.             | Restle (1962)                 |
|                               |                   | 1 Mol.                | 20°C, pH 4,6            | 15 Min.             | Restle (1962), Schäfer (1959) |
|                               |                   | 1 Mol.                | 20°C, pH 5,4            | 150 Min.            | Restle (1962)                 |

## 2.3        INAKTIVIERUNG VON VIREN DURCH PHYSIKALISCHE MITTEL =====

Zur Inaktivierung von Viren mit physikalischen Mitteln kommen vor allem in Betracht

a) Wärme, und

b) ultraviolette Strahlung.

Weniger geeignet und für die Herstellung von Impfstoffen unbedeutend sind Behandlungen mit

c) Ultraschall (MAALE 1959), und

d) Röntgen-,  $\alpha$  - und  $\gamma$  -Strahlen (DILOVSKY 1972)

### 2.3.1        Inaktivierung durch Wärme =====

Die Wärmeempfindlichkeit und damit auch die Intensität und Einwirkungsdauer der für eine Inaktivierung von Viren notwendigen hohen Temperaturen ist von Virusgruppe zu Virusgruppe und von Virusart zu Virusart unterschiedlich. Selbst innerhalb einer Virusart sind Unterschiede möglich, wie z.B. MAYR, STROHMAIER und LORENZ (1961) am Beispiel des Teschen-virus zeigten: beim Virusstamm Konratice nahm die Resistenz gegenüber einer Temperatur von 56°C mit zunehmender Zahl der Passagen in Schweinenierenzellkulturen kontinuierlich ab (siehe Abbildung 4).

Den Ablauf der Wärmeinaktivierung von Viren beschreibt WOESE (1960). Danach sind zu unterscheiden:

- a) eine rasch einsetzende Wirkung auf die Virusnukleinsäure, und
- b) eine langsamer einsetzende Wirkung auf das Virusprotein.

Dieser biphasische Inaktivierungsablauf ist für die Impfstoffherstellung von großer Bedeutung: die Kurzzeit-Inaktivierung bei hoher Temperatur beeinträchtigt die immunogenen Eigenschaften eines Virus weniger als die länger andauernde Einwirkung niedrigerer Temperaturen, wie YOUNGNER (1956), NORMAN (1960), DOUGHERTY (1961) und KOCH (1962) am Beispiel des Poliomyelitisvirus nachwiesen kommt es bei hohen Temperaturen vorzugsweise zu Reaktionen 2. Ordnung.

Reaktionen 2. Ordnung werden auch sichtbar, wenn die Viruspopulation bezüglich ihrer Thermoresistenz heterogen ist. Werden in diesem Fall die thermoresistenten Mutanten getrennt einer Wärmeinaktivierung unterzogen, so verläuft diese als Reaktion 1. Ordnung. Solche Ergebnisse erzielten z.B. PAPADEVANGELOU und YOUNGNER (1961) sowie KOCH (1962) mit Poliomylitisvirus bei Temperaturen von 56°C, 60°C und 70°C, außerdem BROWN, CARTWRIGHT und STEWART (1963) und WITTMANN (1967) mit Maul- und Klauenseuche-Virus bei 56°C.

### 2.3.2      Inaktivierung durch ultraviolette Strahlung =====

Die Inaktivierung von Viren durch ultraviolette Strahlung beruht auf der Absorption von Lichtquanten. Diese Energieaufnahme führt zum Verlust der Infektiosität (DREES 1965). Die Reaktion läuft in 2 Stufen ab. Es kommt zunächst zu einer reversiblen Hydratation der Pyrimidin-Doppelbindungen und daran anschließend zu einer stabilen Dimerisation der Pyrimidine (BEUKERS 1960, STELOW 1968, PFEFFERKORN und COADY 1968).

Nach der Inaktivierung von Viren durch ultraviolette Strahlung kann es zu Reaktivierungen kommen, und zwar insbesondere nach zu geringer Strahlungsintensität oder hoher Nucleinsäurekonzentration im Reaktionsmilieu (BARRY 1961, PFEFFERKORN 1965, DILOVSKY 1970, KELLOFF 1970, FURUSE und WATANABE 1971).

Die inaktivierende Wirksamkeit der ultravioletten Strahlen ist abhängig von ihrer Wellenlänge. Die verschiedenen Virusarten weisen ein unterschiedliches Absorptionsspektrum auf. Allgemein am besten wirksam sind Wellenlängen zwischen 2000 und 3000 Å (GARD und MAALE 1959). Die Anwendung der optimal wirksamen Wellenlänge führt zu einer Inaktivierungsreaktion 1. Ordnung (DREES 1965, BARRY 1961, BROWN, CARTWRIGHT und STEWART 1963).

In der Literatur finden sich über die bei einzelnen Virusarten optimal wirksamen Wellenlängen der ultravioletten Strahlen folgende Angaben:

|                                          |                                                                                                    |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MKS, Typ O <sub>2</sub> :                | 2650 Å (STROHMAIER und GEISS 1960),                                                                |
| Poliomyelitis:                           | 2540 Å (NORMAN 1960),                                                                              |
| Herpes simplex:                          | 2200 - 3000 Å (ROSS, CAMERON und WILDY 1972,<br>CAMERON 1973),                                     |
| Aujeszky:                                | 3200 - 4000 Å (PFEFFERKORN 1965), bzw.<br>2000 - 4000 Erg/Sek/mm <sup>2</sup> (DILOVSKY 1970),     |
| Vaccinia:                                | 2700 Å (SIMME und BEDSON 1973),                                                                    |
| Rous Sarkom und<br>Tabakmosaik:          | 2200 Å (HOLLAENDER und DUGGAR 1936,<br>HOLLAENDER und OLIPHANT 1944,<br>McLAREN und SCHUGAR 1964), |
| Phagen T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> : | 2800 Å (ZELLE und HOLLAENDER 1954,<br>SIMME und BEDSON 1973).                                      |

FELLOWES (1965) untersuchte am Maul- und Klauenseuche-Virus, Typ A, den Einfluß von ultravioletten Strahlen auf die  $\beta$ -Propiolacton-Inaktivierung. Während bei bloßer Verwendung von  $\beta$ -Propiolacton (0,005 %, pH 8,0, 37°C) bis zur Inaktivierung des Virus 6 Stunden vergingen, kam es nach vorangegangener Bestrahlung (48 mW/cm<sup>2</sup>, 10 Minuten) unter den gleichen Versuchsbedingungen schon nach 15 Minuten zur Inaktivierung des Virus.

## 2.4        INAKTIVIERUNG VON REOVIREN =====

### 2.4.1      Inaktivierung durch chemische Mittel =====

Die ersten Versuche, Reoviren durch chemische Mittel zu inaktivieren, wurden von STANLEY, DORMAN und PONSFORD (1953, 1954) durchgeführt. Als Virusmaterial verwendeten sie dazu eine 10 %ige Gehirnsuspension von Mäusen, die mit dem von ihnen isolierten Hepato-Enzephalomyelitis-Virus (= Reovirus Serotyp 3) infiziert worden waren. Bei Zimmertemperatur und unter gleichzeitiger Einwirkung von Formalin (0,25 % und 3 %), Lysol (2 %), Phenol (0,25 % und 1 %) sowie Wasserstoffperoxyd (1 %) erwies sich das Virus nach 1 Stunde noch als infektiös. Dagegen wurde das Virus mit Formalin (3 %) bei einer Temperatur von 56° C sowie durch Äthylalkohol (70 %) bei Zimmertemperatur innerhalb 1 Stunde inaktiviert.

Später gelang HULL, MINNER und SMITH (1956), HULL, MINNER, CARMINE und MASCOLI (1958) unter Verwendung von infektiöser Zellkulturflüssigkeit die Inaktivierung der Virusstämme SV<sub>12</sub> und SV<sub>59</sub>, die von ROSEN (1960) als Reovirus Serotyp 1 bzw. Serotyp 2 charakterisiert worden waren, mit Formalin in einer Endkonzentration von 0,025 % bei 37°C innerhalb 96 Stunden (Typ 1) bzw. 48 Stunden (Typ 2).

Die Verwendung von  $\beta$ -Propiolacton als Inaktivierungsmittel für Reoviren wird von SHEFKI und BENGE (1969) beschrieben. Infektiöse Zellkulturflüssigkeit des vom Rind isolierten Reovirus Typ 1 - Stammes WBR-26 mit einem Infektiositätstiter von  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml wurde innerhalb 2 Stunden bei 37°C inaktiviert. Angaben über die Konzentration des Inaktivierungsmittels liegen nicht vor.

### 2.4.2      Inaktivierung durch Wärme =====

Reoviren sind relativ temperaturstabil. Nach RHIM, SMITH und JENICK (1961) fällt der Infektiositätstiter des Reovirus

Serotyp 1 (Zellkulturflüssigkeit) innerhalb 14 Tagen bei 4°C um 1 log, bei 24°C um 2,2 log und bei 37°C um 5,6 log KID<sub>50</sub>.

Auch gegenüber höheren Temperaturen ist das Virus sehr resistent. Der Serotyp 3 (10 %ige Suspension von infektiösem Mäusegehirn) erwies sich bei 56° C nach 2 Stunden und bei 60° C nach 30 Minuten noch als infektiös (STANLEY, DORMAN und PONSFORD 1954). Selbst eine Temperatur von 65° C reicht nach HULL, MINNER und SMITH (1956), HULL, MINNER, CARMINE und MASCOLI (1958) nicht aus, um Reoviren des Serotyps 1 (Stamm SV<sub>12</sub>) und Serotyps 2 (Stamm SV<sub>59</sub>) innerhalb 30 Minuten zu inaktivieren.

Gereinigte Virussuspensionen und reine Reovirus-RNS weisen eine geringere Temperaturresistenz auf. So inaktivierten RHIM, SMITH und MELNICK (1961) eine gereinigte Virussuspension des Reovirus Typ 2 bei 56° C innerhalb 45 Minuten und LOH und OIE (1969) reine RNS des Reovirus Typ 2 bei 56° C innerhalb 30 Minuten.

#### 2.4.3 Inaktivierung durch ultraviolette Strahlung =====

LOH und OIE (1969) inaktivierten eine Suspension von Reovirus Typ 2 mittels ultravioletter Strahlen. Die Strahlungsenergie betrug dabei 10<sup>5</sup> Erg/Sek/cm<sup>2</sup>, die Menge der Virussuspension 10 ml und die Bestrahlungsdistanz 10 cm.

Eine Behandlung mit ultravioletten Strahlen hat bei Reoviren nicht nur einen Verlust der Infektiosität zur Folge, sie führt außerdem zu einer Zerstörung der hämagglutinierenden Aktivität.

Bei einer Reovirus Typ 2-Suspension fiel der Hämagglutinationstiter von 1:64 innerhalb 5 Minuten auf 1:32, nach 10 Minuten betrug er 1:16 und nach 20 Minuten 1:4. 30 Minuten nach Versuchsbeginn war kein Hämagglutinin mehr nachweisbar (SUBASHINGE und LOH 1972).

2.5

IMPfstoff GEGEN REOVIRUS-INFEKTIONEN

In der Literatur wird nur ein Impfstoff gegen die Reovirus Typ 1 - Infektion des Rindes beschrieben (SHEFKI und BENGE 1969). Grundlage des Impfstoffes ist der vom Rind isolierte Reovirusstamm WBR-26, der von LAMONT (1968) als Reovirus Serotyp 1 klassifiziert worden ist. Das Virus wird in BHK-21 - Zellkulturen gezüchtet und mit  $\beta$ -Propiolacton bei 37° C auf die Dauer von 2 Stunden inaktiviert. Als Adjuvans dient Aluminiumhydroxyd ("Alhydrogel") in einer Endkonzentration von 20 Vol. %. Eine Impfdosis enthält mindestens  $10^7$  Einheiten des Virus.

Die Reovirus-Vakzine ist als Komponente in zwei Kombinationsimpfstoffen der Firma Crookes (England) enthalten:

- a) "Pneumovac" (Parainfluenza 3-Rinderadenovirus Typ 3 - Reovirus Typ 1 - Impfstoff), und
- b) "Pneumovac Plus" (Parainfluenza 3 - Rinderadenovirus Typ 3 - Reovirus Typ 1 - Rhinotracheitis - Virusdiarrhoe/Mucosal Disease - Impfstoff).

Der Impfstoffhersteller empfiehlt eine zweimalige intramuskuläre Impfung im Abstand von 2 - 4 Wochen.

## 2.6            ANTIKÖRPER UND IMMUNITÄT GEGEN DIE REOVIRUS-INFESTION =====

### 2.6.1        Allgemeines =====

Entsprechend ihrer Antigenstruktur stimulieren Reoviren im infizierten Organismus die Bildung komplementbindender, neutralisierender und hämagglutinationshemmender Serumantikörper (SABIN 1959, ROSEN 1960, STANLEY, DORMAN und PONSFORD 1953).

Komplementbindende Reovirus-Antikörper sind nicht typ-, sondern nur gruppenspezifisch (SABIN 1959, ROSEN 1960).

Beim Nachweis neutralisierender Antikörper sind Schwierigkeiten beschrieben worden. Nach ROSEN (1964, 1968) ist es notwendig, im Neutralisationstest mit großen Antigenmengen zu arbeiten, um in Zellkulturen virusspezifische von unspezifischen Degenerationserscheinungen unterscheiden zu können, was andererseits zur Folge hat, daß kleine Antikörpermengen nicht mehr nachzuweisen sind. Aus diesem Grund hält ROSEN (1964, 1968) den Neutralisationstest zum Nachweis von Reovirus-Antikörpern für zu gering empfindlich und zieht deshalb den Hämagglutinationshemmungstest vor.

Auch SCHMIDT, LENETTE und HANAHOE (1966) konnten in Seren verschiedener Tierarten neutralisierende Antikörper seltener nachweisen als hämagglutinationshemmende, interpretieren dies aber nicht als geringere Empfindlichkeit des Neutralisationstestes. Vielmehr folgern sie, daß die Reaktionen im Hämagglutinationshemmungstest weniger spezifisch sind als im Neutralisationstest.

Zur indirekten Diagnose von Reovirusinfektionen hat sich der Hämagglutinationshemmungstest, d.h. der Nachweis hämagglutinationshemmender Serumantikörper allgemein durchgesetzt, wenn- gleich auch dieser Methode Nachteile anhaften. Als möglicherweise störend haben sich erwiesen

- a) Kreuzreaktionen zwischen den 3 Reovirus-Serotypen, und
- b) unspezifische, gegen das Reovirus-Hämagglutinin gerichtete Serum-inhibitoren.

Im Hämagglutinationshemmungstest zeigen die 3 Reovirus-Serotypen eine antigene Verwandtschaft, die zwischen den Serotypen 1 und 2 enger ist als zwischen den Serotypen 1 bzw. 2 und dem Serotyp 3. Bei Mensch und Tier kommt es nach Infektion mit den Serotypen 1 oder 2 manchmal zur Bildung heterologer hämagglutinationshemmender Serumantikörper, was nach Infektion mit dem Serotyp 3 seltener zu beobachten ist (ROSEN, HOVIS, MASTROTA, BELL und HUEBNER 1960 a, b, ROSEN, EVANS und SPICKARD 1963, ROSEN, ABINANTI und HOVIS 1963, TRAINOR, MOHANTY und HETRICK 1966, LAMONT, DARBYSHIRE, DAWSON, OMAR und JENNINGS 1968).

Unspezifische, gegen das Reovirus-Hämagglutinin gerichtete Inhibitoren in Blutseren sind von mehreren Autoren beschrieben worden.

Die in Humanseren vorkommenden Inhibitoren sind als hitzestabile Phospholipidkomplexe bzw. als Lipoprotein oder als eine mit Lipoprotein gekoppelte Substanz charakterisiert worden (SCHMIDT, DENNIS, HOFFMAN und LENETTE 1964, MANN, ROSSEN, LEHRICH und KASEL 1967). Zur Eliminierung dieser Inhibitoren aus Blutseren empfehlen MANN, ROSSEN, LEHRICH und KASEL (1967) eine kombinierte Manganchlorid-Heparin-Behandlung. Diese Behandlung führt nach Angaben der Autoren zur sicheren Entfernung der unspezifischen Inhibitoren und hat außerdem den Vorteil, daß gleichzeitig weniger als 10 % der Immunglobuline ausgeschaltet werden, während eine Serumbehandlung mit Kaolin in 12,5 %iger Konzentration zum Verlust von 40 - 60 % der Immunglobuline führt.

Nach Untersuchungen von WIZIGMANN (1971) sind die Titer hämagglutinationshemmender Antikörper in Rinderseren direkt abhängig von der bei der Vorbehandlung der Seren verwendeten Kaolinkonzentration. Kaolin, in einer Endkonzentration von 25 % eingesetzt, kann, verglichen mit Ergebnissen bei unbehandelten Seren, ein Absinken der Antikörpertiter um 2 - 3 2er-Potenzen bewirken. Eine 50 %ige Kaolinkonzentration läßt selbst hohe Antikörpertiter auf Werte von unter 1:8 absinken. Die Einwirkungszeit des Kaolins (5 - 60 Minuten) bleibt dabei ohne Einfluß.

Auch bei Schweineseren führt die Behandlung mit Kaolin zu einem starken Rückgang der Titer hämagglutinationshemmender Antikörper, während eine Manganchlorid-Heparin-Behandlung zu unterschiedlichen Ergebnissen führt: von 17 Seren zeigten 8 einen Titerabfall um 1 - 3 2er-Potenzen, zwei Seren einen Titeranstieg und bei 7 Seren blieb der Titer gleich (WUNDERLICH 1972).

Bei Mäuseseren reduziert eine Behandlung mit Kaolin nach HARTLEY, ROWE und HUEBNER (1961) den Titer hämagglutinationshemmender Serumantikörper um das 4 - 8fache.

## 2.6.2      Antikörper und Immunität beim Rind =====

Sowohl nach natürlicher wie experimenteller Infektion mit Reoviren kommt es beim Rind zur Bildung von hämagglutinationshemmenden Antikörpern. Sie sind im Blutserum nachweisbar.

Die Angaben über die Höhe der Titer hämagglutinationshemmender Antikörper sind sehr unterschiedlich und variieren zwischen 1:10 und 1:1280 (ROSEN, ABINANTI und HOVIS 1963, ABINANTI 1963, WIZIGMANN und REINHARDT 1971).

Nach experimenteller intranasaler und intratrachealer Infektion sind hämagglutinationshemmende Reovirus-Antikörper im Blutserum frühestens am 3. oder 4. Tag, nach anderen Angaben ab dem 6. - 14. Tag nach der Infektion nachweisbar (LAMONT, DARBYSHIRE, DAWSON, OMAR und JENNINGS 1968, ROSEN und ABINANTI 1960, TRAINOR, MOHANTY und HETRICK 1966).

Der Antikörperspiegel steigt kontinuierlich an und erreicht 12 - 28 Tage nach der Infektion maximale Werte (ROSEN und ABINANTI 1960, TRAINOR, MOHANTY und HETRICK 1966, LAMONT, DARBYSHIRE, DAWSON, OMAR und JENNINGS 1968).

LAMONT, DARBYSHIRE, DAWSON, OMAR und JENNINGS (1968) haben bei 3 Kälbern ein Persistieren der höchsten Titer hämagglutinationshemmender Antikörper über mindestens 3, 9 bzw. 15 Monate festgestellt, dagegen war bei einem 4. Kalb der Titer 1 Jahr nach der Infektion wieder signifikant abgesunken.

Über die Beziehungen zwischen dem Titer humoraler Antikörper und Immunität gegen Reoviren ist noch wenig bekannt. Nach PHILLIP (1969) ist ein Neutralisationskoeffizient von  $10^{1,5}$  beim Kalb der Ausdruck für eine solide Immunität.

#### 2.6.3 Bildung von Reovirus-Antikörpern in der Maus

In Mäusen führt die Infektion mit Reoviren zur Bildung von humoralen, hämagglutinationshemmenden Serumantikörpern.

HARTLEY, ROWE und HUEBNER (1961) kamen bei der Herstellung von Reovirus-Immunseren zu folgenden Ergebnissen.

3 Wochen nach einmaliger intraperitonealer Infektion mit infektiöser Zellkulturflüssigkeit der Reovirus-Serotypen 1, 2 und 3 lagen die Titer hämagglutinationshemmender Serumantikörper bei 1:160 und 7 - 10 Tage nach einer Wiederholungsimpfung (3 Wochen nach der Erstimpfung) bei 1:1280.

#### 2.6.4 Antikörper und Immunität beim Rind nach Impfung mit Reovirus Serotyp 1 - Vakzine

SHEFKI und BENGE (1969) berichten über die Bildung von Antikörpern nach Impfung mit dem von ihnen entwickelten Kombinations-Antigenimpfstoff, der außer gegen die Reovirus Typ 1 - Infektion auch gegen die Rinderadenovirus Typ 3 - und die Parainfluenza 3 - Infektion gerichtet ist (siehe Kapitel 2.5).

Bei einem Versuch mit 7 Kälbern erfolgte eine zweimalige intramuskuläre Impfung im Abstand von 14 Tagen. Vor der ersten Impfung waren bei den Tieren keine hämagglutinationshemmenden Serumantikörper nachweisbar (Titer kleiner als 1:20). Auf die erste Impfung reagierten 6 von 7 Kälbern mit der Bildung von Antikörpern (Titer 1:40 bis 1:80). 14 Tage nach der Wiederholungsimpfung lagen die Serumantikörpertiter zwischen 1:160 und 1:5120. Mit 1:160 wies dasjenige Tier, welches auf die erste Impfung nicht serologisch nachweisbar reagiert hatte, den niedrigsten Antikörpertiter auf.

### 3. E I G E N E   U N T E R S U C H U N G E N =====

#### 3.1 MATERIAL UND METHODEN =====

##### 3.1.1 Zellkulturen =====

Für die Untersuchungen sind Kulturen aus Verozellen (African green monkey kidney cell line) verwendet worden. Von dichten, in Roux-Schalen gewachsenen Zellkulturen wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen mit 30 ml einer 0,02 %igen Versenlösung überschichtet und bei +37°C 4 - 6 Minuten lang inkubiert. Nach dem Abgießen des Versens wurde der Zellrasen mit 30 ml Erhaltungsmedium gewaschen und anschließend die Zellen mit 30 ml Anzuchtmedium durch kräftiges Schütteln und Pipettieren suspendiert. Die Weiterzüchtung der Zellen erfolgte mit Vermehrungsraten von 1:2 bis 1:3 als Rollerkulturen (Flaschen mit ca. 1000 cm<sup>2</sup> Kulturfläche und Röhrchen; 12 U/min.) oder als stationäre Kulturen (Roux-Schalen und Röhrchen) bei 37°C.

Das Anzuchtmedium setzte sich zusammen aus  
77,4 % Hanks'scher Lösung,  
10 % fötalem Kälberserum,  
10 % Laktalbuminhydrolysat (5%ige Lösung),  
2 % Phenolrot (0,1%ige Lösung),  
0,6 % NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (10%ig), und  
Antibiotika (200 I.E. Penicillin und 200 Dihydrostreptomycin pro ml).

Als Erhaltungsmedium diente das Leibowitz-Medium Nr. 15 (L-15) mit der üblichen Antibiotika-Zugabe. Für Röhrchenkulturen enthielt das Erhaltungsmedium zusätzlich 1,5 % fötales Kälberserum.

##### 3.1.2 Virusstamm =====

Als Ausgangsmaterial für die Testantigen- und Infektionserstellung wurde ein vom Menschen isoliertes Reovirus, Serotyp 1, Stamm "Lang",

---

\*) Für die Überlassung des Virusstammes danken wir Herrn Dr. LAMONT Central Veterinary Laboratory, Weybridge/England.

verwendet. Der Virusstamm lag in der 11. Verozellen-Kulturpassage vor.

### 3.1.3      Viruszüchtung und Gewinnung des Virusmaterials =====

Die Vermehrung des Reovirus erfolgte in Verozellen. Von dichten, in Rollerflaschen gewachsenen Kulturen wurde das Anzuchtmedium durch Erhaltungsmedium (200 oder 300 ml) ersetzt und dann die Kulturen mit 20 ml unverdünntem Virusmaterial infiziert. Die Bebrütung bei 37°C unter Rotation dauerte 4 - 6 Tage und führte in diesem Zeitraum zu einer 90 - 95 %igen Zerstörung des Zellrasens. Danach wurden die Kulturen kurzfristig bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut und der Zelldetritus durch Zentrifugieren (1500 g während 30 Minuten) entfernt. Die infektiöse Zellkulturflüssigkeit wurde in Mengen von 10 ml (Testantigen) bzw. 200 ml (Impfstoff-Ausgangsmaterial) abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.1.4      Virustitrationen =====

#### 3.1.4.1    Titration der Infektiosität

Die Virussuspensionen sind mit Erhaltungsmedium in Potenzen von 10 verdünnt und pro Verdünnungsstufe 4 Röhrchenkulturen mit je 0,1 ml beimpft worden.

Als positiv galten Zellkulturen, deren Rasen bei der nachfolgenden Bebrütung (37°C) innerhalb 10 Tagen virusspezifisch degenerierten.

Die Berechnung der Infektiositätstiter erfolgte nach der Methode von SPEARMAN-KÄRBER (BONIN 1964).

#### 3.1.4.2    Titration des Hämagglutinins

Für Titration des Reovirus-Hämagglutinins kam die Mikromethode (System Cooke, Reaktionsmengen 0,025 ml) zur Anwendung. Hierzu wurde in Übertragplatten mit physiologischer NaCl-Lösung (0,85 %ig, pH 7,2) eine in 2er-Potenzen steigende Verdünnungsreihe des Antigens hergestellt und auf V-Platten, in denen

physiologische NaCl vorgelegt worden war, übertragen. Nach Zugabe einer 1 %igen Suspension von Humanerythrozyten der Blutgruppe O und leichtem Schütteln blieben die Platten bei Zimmertemperatur stehen.

Die Ablesung erfolgte nach vollständiger Sedimentation der Erythrozyten (ca. 60 Minuten). Als Endtiter galt die höchste Antigenverdünnung, die noch eine vollständige Agglutination der Erythrozyten bewirkte.

### 3.1.5        Virusinaktivierung =====

#### 3.1.5.1    Inaktivierung durch Hitze

Zur Inaktivierung mittels Hitze wurde unverdünnte, infektiöse Reovirus-Suspension (10 ml pro Versuch) mit Hilfe einer Schlauchpumpe und eines Siliconschlauches ( $\varnothing$  2 mm) durch ein auf 95° C erhitztes Wasserbad geleitet. Die Inaktivierungszeiten (3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 60, 90 und 120 Sekunden) wurden bei gleichbleibender Durchflußgeschwindigkeit durch die Länge des im Wasserbad liegenden Schlauches bestimmt. Die Unterbrechung des Inaktivierungsprozesses erfolgte durch Einführen des Schlauches in ein Eisbad (1 - 3° C). Kontrollsuspensionen durchliefen den Siliconschlauch bei Zimmertemperatur.

#### 3.1.5.2    Inaktivierung durch Formalin

Die Inaktivierung des Reovirus erfolgte durch Zugabe von Formaldehydlösung (Formaldehydlösung 35 %, Merck, DAB 7, 1:40 verdünnt mit Aqua dest.) zur Virussuspension und anschließende Inkubation der Versuchsgemische (50 ml pro Versuch) bei 37°C im Wasserbad. Das Mischungsverhältnis war je nach gewünschter Formaldehyd-Endkonzentration (1:4000, 1:2000 und 1:1000) 1:100, 1:50 bzw. 1:25. Durch die Zugabe von konzentrierter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wurde der pH-Wert vor Versuchsbeginn auf einen Wert von 7,0 justiert. Zur Kontrolle der Virusinaktivierung wurden in folgenden Zeitabständen aus den Reaktionsgemischen Proben von jeweils 1 ml entnommen: bei

Formalinendkonzentrationen von 1:4000 und 1:2000 12, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden, bei der Formalinkonzentration von 1:1000 4, 10, 22, 28, 34, 48, 52 und 60 Stunden nach Versuchsbeginn. Sofort nach der Entnahme sind die Proben gekühlt und die Restinfektiosität durch Titration bestimmt worden.

Bei Versuchen mit einer Formalinkonzentration von 1:1000 erfolgte zudem eine Neutralisierung des Formalins mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (0,5 %ig) vor dem Anlegen der Titrationen bzw. dem Verimpfen der Proben auf Zellkulturen.

Zur Kontrolle sind Virussuspensionen ohne Formalinzusatz bei  $+4^\circ$  und  $+37^\circ$  C bebrütet und fortlaufend titriert worden.

### 3.1.5.3 Kontrolle der völligen Inaktivierung des Reovirus

Zum Nachweis einer völligen Inaktivierung des Reovirus wurden von den zu untersuchenden Suspensionen in Verozellen-Rollerkulturen (Röhrchen) 2 Blindpassagen angelegt. Die Beobachtungszeit betrug in der 1. Passage 6 Tage, in der 2. Passage 14 Tage. Das Ausbleiben eines virusspezifischen, degenerativen Effektes in den beimpften Zellkulturen galt als Beweis für die vollständige Inaktivierung des Reovirus.

### 3.1.6 Versuchsimpfstoffe

=====

Auf der Basis von inaktiviertem Reovirus Serotyp 1 sind folgende Versuchsimpfstoffe hergestellt und auf ihre antigene Wirksamkeit in Mäusen geprüft worden:

Impfstoff 1: Hitzeinaktiviertes Virus ( $95^\circ\text{C}$ , 15 Sekunden);

Impfstoff 2: dto., mit Zusatz von 20 % einer 1,8 %igen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Suspension;

Impfstoff 3: dto., mit Zusatz von 20 % einer 1,8 %igen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Suspension und 0,0125 % Saponin;

Impfstoff 4: Formalininaktiviertes Virus (Formaldehyd 1:1000, 60 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$ );

Impfstoff 5: dto., mit Zusatz von 20 % einer 1,8 %igen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Suspension;

Impfstoff 6: dto., mit Zusatz von 20 % einer 1,8 %igen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Suspension und 0,0125 % Saponin.

### 3.1.7 Versuchstiere, Impfschema und Serumgewinnung =====

Die Prüfung der Impfstoffe auf ihre Fähigkeit, die Bildung humoraler Antikörper zu stimulieren, erfolgte in weißen Mäusen des Stammes NMRI. Sie waren bei Versuchsbeginn 6 Wochen alt und wogen ca. 30 Gramm.

Die Mäuse sind subkutan am Rücken geimpft worden. Die Menge einer Impfstoffdosis betrug 0,8 ml (Impfstoffe o h n e Adjuvantien) bzw. 1,0 ml (Impfstoffe m i t Adjuvantien). Für jeden Impfstoff wurden 2 Gruppen zu je 15 Mäusen verwendet. Die Tiere der 1. Gruppe wurden 21 Tage nach der Impfung getötet, das Blutserum gewonnen und gepoolt. In der 2. Gruppe sind die Tiere 21 Tage nach der 1. Impfung revakziniert, nach weiteren 10 Tagen getötet und die Blutseren ebenfalls gewonnen und gepoolt worden.

Als Kontrollen dienten 2 Gruppen von je 10 ungeimpften Mäusen. Eine Gruppe wurde zu Beginn, die andere am Ende der Impfstoffversuche getötet. Die Serumpools dieser beiden Mäusegruppen stellten die negativen Kontrollseren dar.

Zur Blutgewinnung sind die Mäuse narkotisiert, die Karotiden und Jugularisvenen durchtrennt und das Blut in kleinen Petrischälchen aufgefangen worden. Die Schälchen blieben zunächst 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und kamen dann nach Anlegen mehrerer Schnitte durch das Koagulum für weitere 4 - 5 Stunden in den Kühlschrank. Die Serumgewinnung erfolgte durch Zentrifugation des Serums und Koagulums bei 1500 g über 20 Minuten. Das überstehende Blutserum wurde abermals zentrifugiert und dann der Überstand als Ausgangsmaterial für die Serumuntersuchungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.8 Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegenüber ===== Reovirus Serotyp 1 in Mäuseren =====

Zum Nachweis von Reovirus Typ 1 - Antikörpern in den Mäuseren kamen parallel 2 verschiedene Methoden zur Anwendung: der Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test) und der Neutrali-

sationstest (N-Test). Vor dem Ansetzen der Versuchsreihen sind alle Seren während 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktiviert worden.

### 3.1.8.1 Hämagglutinationshemmungstest

#### 3.1.8.1.1 Vorbehandlung der Seren

Dem Hauptversuch ging eine Behandlung der Seren zur Eliminierung unspezifischer Inhibitoren und Isoagglutininen voraus.

Die Inhibitorbehandlung folgte den von MANN, ROSSEN, LEHRICH und KASEL (1967) beschriebenen Methoden mit Kaolin bzw. Heparin-Manganchlorid.

Zur Behandlung mit K a o l i n wurde 1 ml Serum mit 1 ml Kaolinsuspension (25 %ig in physiologischer NaCl) gemischt. Einer Inkubation von 20 Minuten bei Zimmertemperatur folgte die Abtrennung des Kaolins durch Zentrifugation (1500 g, 15 Minuten). Der Überstand galt als Serumverdünnung  $2^{-1}$ .

Zur Behandlung mit Heparin-Manganchlorid wurde 1 ml Serum 0,05 ml einer molaren  $MnCl_2$ -Lösung, 0,04 ml Heparinlösung (5000 I.E./ml) und 0,91 ml physiologische NaCl zugegeben. Die Mischung blieb 20 Minuten bei +4°C stehen und wurde anschließend zentrifugiert (10 Minuten bei 600 g). Der Überstand wurde als Serumverdünnung  $2^{-1}$  angesehen.

Beide Methoden kamen parallel zur Anwendung. Zu Vergleichszwecken wurde Serum nur mit NaCl verdünnt (Serumverdünnung  $2^{-1}$ ). Alle vorbehandelten und nur mit NaCl verdünnten Seren wurden anschließend zur Eliminierung von Isoagglutininen 1:2 mit einer 10 %igen Suspension von Humanerythrozyten (Blutgruppe O) versetzt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Nach dem Abtrennen der Erythrozyten durch Zentrifugation (15 Minuten bei 600 g) diente der Überstand (Serumverdünnung  $2^{-2}$ ) als Ausgangsmaterial für die im Hauptversuch anzulegende Serumverdünnungsreihe.

### 3.1.8.1.2 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde mit der Mikrotechnik gearbeitet. Die Reaktionsmengen betragen 0,025 ml.

Das Anlegen der Serumverdünnungsreihen in 2er-Potenzen erfolgte in Übertragplatten (Serumverdünnungen  $2^{-2}$  bis  $2^{-13}$ ). Diese Serumverdünnungen wurden in V-Platten übertragen, in deren entsprechende Vertiefungen zuvor Reovirus-Antigen (4 hämagglutinierende Einheiten pro 0,025 ml) einpipettiert worden war. Nach einer Bindungszeit von 1 Stunde bei Zimmertemperatur wurde den Gemischen eine 1 %ige Suspension von Humanerythrozyten (Blutgruppe O) zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln blieben die Platten bei Zimmertemperatur stehen.

In jedem Versuch liefen folgende Kontrollen mit:

NaCl-Kontrolle (NaCl + Erythrozyten),

Testserumkontrolle (Testserum  $2^{-2}$  + Erythrozyten),

Antigenkontrolle (Titration der Antigengebrauchsdosis).

Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte ca. 2 Stunden nach dem Versuchsansatz, sobald die Erythrozyten der NaCl- und Testserumkontrollen vollständig sedimentiert waren.

Als Serumantikörpertiter galt die höchste Serumverdünnung, welche die hämagglutinierende Aktivität des Testantigens noch vollständig hemmte. Als beweisend für eine komplette Hämagglutinations-Hemmung galt das zungenförmige Auslaufen der sedimentierten Erythrozyten nach Schräghalten der Testplatten.

### 3.1.8.2 Neutralisationstest

Der Nachweis neutralisierender, gegen Reovirus Serotyp 1 gerichteter Antikörper in Mäuseseren erfolgte nach der Serumverdünnungsmethode. Die Seren wurden in Potenzen von 2 mit Erhaltungsmedium verdünnt (Verdünnungsstufen  $2^{-1}$  bis  $2^{-10}$ ). Zu je 1 ml Serumverdünnung kam die gleiche Volumenmenge Antigen (ca. 100 KID<sub>50</sub>/0,1 ml). Dem kräftigen Schütteln der Gemische folgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad auf die Dauer von 90 Minuten. Anschließend sind pro Reaktionsgemisch 4 Röhrenkulturen mit je 0,2 ml beimpft und die Kulturen bei 37°C stationär bebrütet worden.

Bis zur mikroskopischen Endablesung der Ergebnisse vergingen 10 Tage. Alle Kulturen, in denen innerhalb dieses Zeitraumes kein den Viruskontrollen vergleichbarer zytopathischer Effekt auftrat, sind im Sinne einer Virusneutralisation als positiv bewertet worden. Die Berechnung der Serumantikörpertiter folgte der Methode von SPEARMAN-KÄRBER (BONIN 1964). Beim Antikörpertitervergleich galt eine Titerdifferenz von mindestens  $2,2 \log_2$  als signifikant.

### 3.2            ERGEBNISSE =====

#### 3.2.1        Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 durch Hitze =====

Zur Überprüfung der Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 durch Wärmeeinwirkung ( $95^{\circ}\text{C}$ ) wurden 3 Versuchsreihen angesetzt. Die ersten beiden Versuche verfolgten lediglich den Zweck, den Zeitpunkt der kompletten Virusinaktivierung zu bestimmen. Dies geschah durch Verimpfen der unverdünnten Virussuspension auf Zellkulturen nach verschieden langer Hitzeeinwirkung. Im dritten Versuch wurden zu verschiedenen Zeiten die Restmengen aktiven Virus durch Titration bestimmt.

Das Ausgangsmaterial aller 3 Versuche hatte einen Infektiositätstiter von  $10^{6,0} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$ .

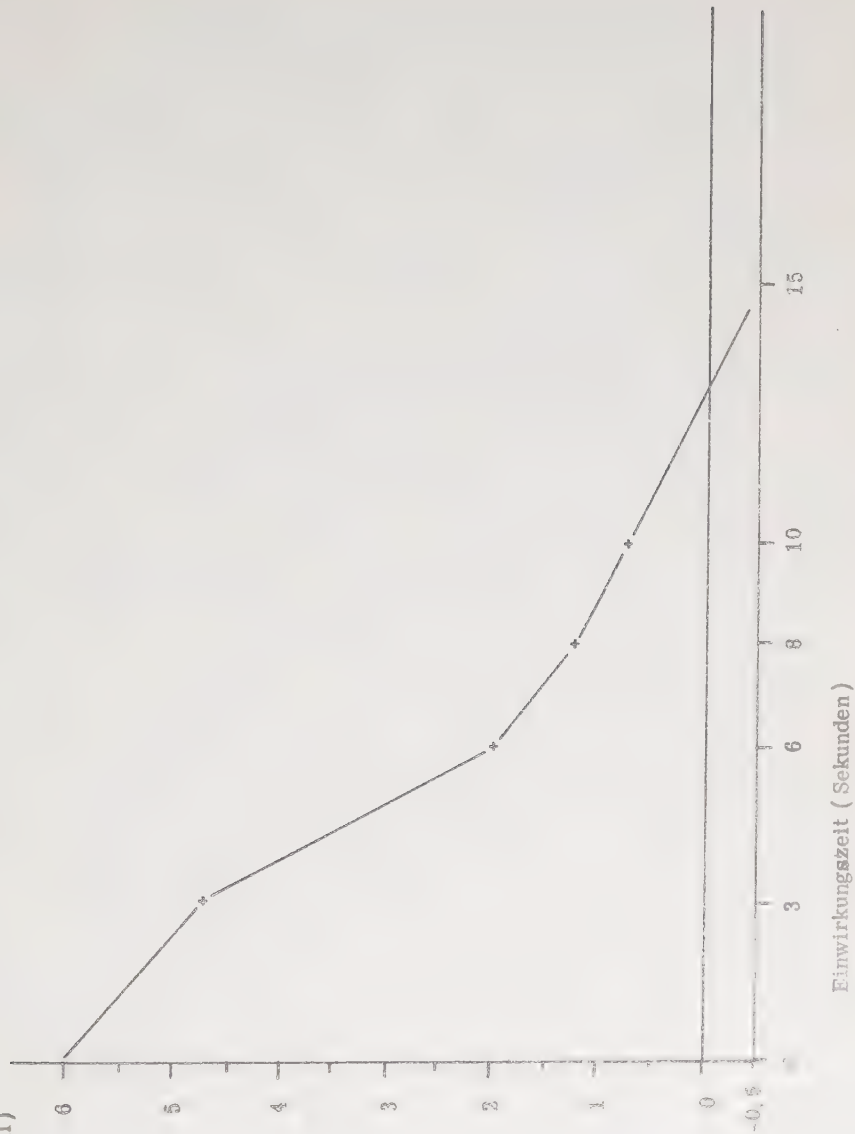
Im ersten Versuch war nach 5 und 10 Sekunden noch aktives Virus nachweisbar, dagegen erwies sich das Reovirus nach 20, 30, 60, 90 und 120 Sekunden vollkommen inaktiv.

Im zweiten Versuch, bei dem nur nach Einwirkungszeiten von 10, 15 und 20 Sekunden Proben entnommen und untersucht worden waren, trat eine vollständige Virusinaktivierung im Zeitraum zwischen 10 und 15 Sekunden auf.

Beim abschließenden 3. Versuch erfolgte die Titration der Restinfektiosität nach 3, 6, 8, 10 und 15 Sekunden Hitzeeinwirkung. Innerhalb von 3 Sekunden betrug die Inaktivierungsrate bereits über 90 % (Titerabfall  $1,25 \log$ ), nach 6 Sekunden sogar schon 99,99 % (Titerabfall  $4 \log$ ). Nach 8 Sekunden war der Titer gegenüber dem Ausgangsmaterial um  $4,75 \log$ , nach

Wärmeinaktivierung von Reovirus, Serotyp 1, bei 95°C

Infektiositätstiter  
(log KID<sub>50</sub>/0,1 ml)



10 Sekunden um 5,25 log niedriger. 15 Sekunden nach Versuchsbeginn konnte kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). Im 3. Versuch wurde außerdem der Einfluß der Hitze auf das Reovirus-Hämagglutinin geprüft. Der Hämagglutinationstiter des Ausgangsmaterials betrug  $2^{-7}$ . Bei dem nach 15 Sekunden vollkommen inaktivierten Virus war der Titer auf kleiner als  $2^{-1}$  abgefallen.

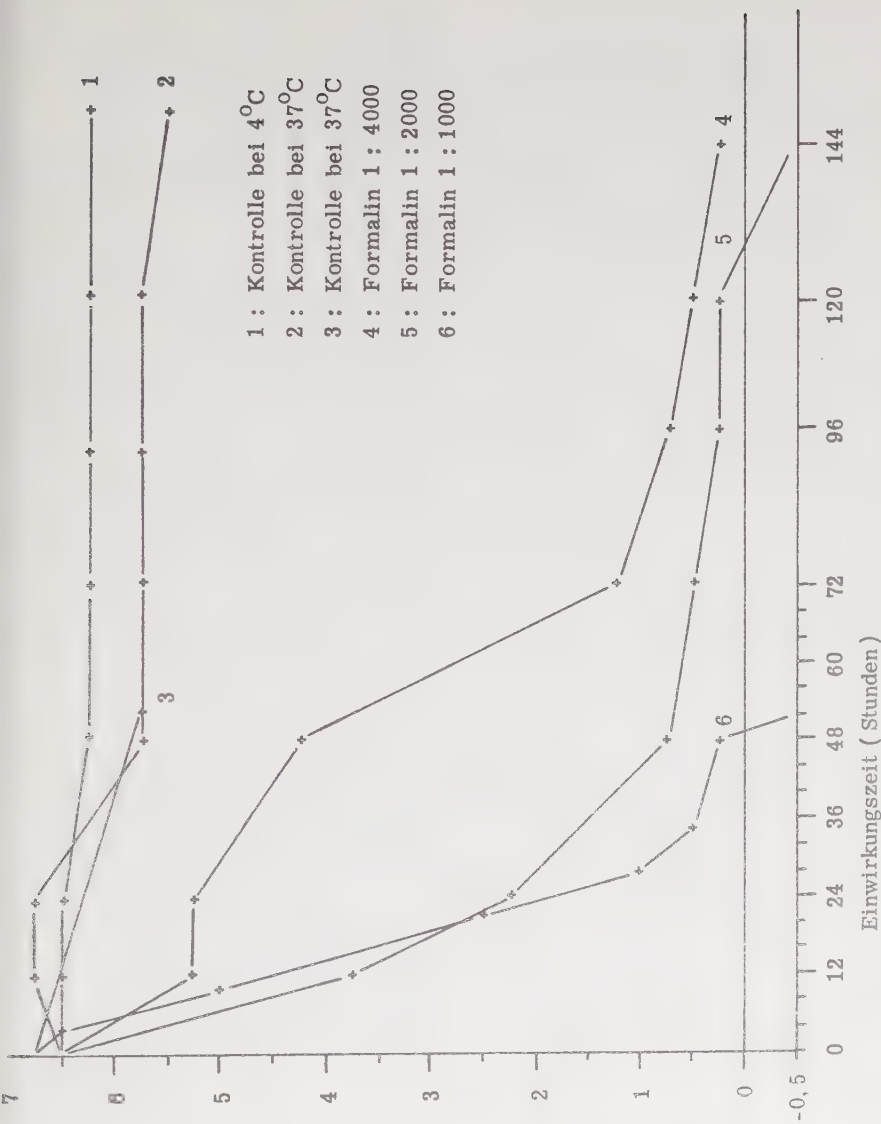
### 3.2.2 Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 durch Formalin

Die Versuche zur Inaktivierung von Reovirus Serotyp 1 liefen bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  ab. Als Kontrollen dienten Virussuspensionen, die ohne Formalinzusatz bei  $+4^{\circ}\text{C}$  und  $+37^{\circ}\text{C}$  inkubiert worden waren. Bei einer Formalinendkonzentration von 1:4000 (0,025 %) fiel der Infektiositätstiter innerhalb 12 Stunden von  $10^{6,5}\text{KID}_{50}/0,1\text{ ml}$  um 1,25 log auf  $10^{5,25}\text{KID}_{50}$  und blieb auf dieser Höhe bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Danach sank der Titer weiter ab auf  $10^{4,25}$  (48 Stunden),  $10^{1,25}$  (72 Stunden),  $10^{0,75}$  (96 Stunden),  $10^{0,5}$  (120 Stunden) und  $10^{0,25}$  (144 Stunden).

Die doppelte Formalinkonzentration (1:2000 = 0,05 %) führte zu einer völligen Inaktivierung innerhalb 144 Stunden. Der Titer sank von  $10^{6,5}\text{KID}_{50}/0,1\text{ ml}$  innerhalb kurzer Zeit sehr rasch ab: nach 12 Stunden betrug er nur noch  $10^{3,75}\text{KID}_{50}$  und nach 24 Stunden  $10^{2,25}\text{KID}_{50}/0,1\text{ ml}$ . Danach verlief die Inaktivierung wesentlich langsamer: die Infektiositätstiter waren  $10^{1,75}$  (48 Stunden),  $10^{0,5}$  (72 Stunden) und  $10^{0,25}\text{KID}_{50}/0,1\text{ ml}$  (96 und 120 Stunden nach Versuchsbeginn).

Bei einer Formalinkonzentration von 1:1000 (0,1 %) sank der Infektiositätstiter des Reovirus von  $10^{6,75}\text{KID}_{50}/0,1\text{ ml}$  anfangs rasch auf  $10^{6,5}$  (4 Stunden) bzw.  $10^{5,8}$  (10 Stunden). Danach stellte sich die Restinfektiosität auf  $10^{1,0}$  (22 Stunden),  $10^{1,0}$  (28 Stunden),  $10^{0,5}$  (48 Stunden) und  $10^{0,25}$  (72 Stunden) ein. Nach 96 Stunden nach Versuchsbeginn war kein Virus mehr nachweisbar.

Infektiositätstiter  
(log KID<sub>50</sub>/0,1 ml)



Verlauf der Inaktivierung von Reovirus, Serotyp 1, durch Formalin  
(1 : 1000 bis 1 : 4000 bei 37°C und pH 7,0)

Bei einem 2. Versuch mit der Formalinkonzentration 1:1000, in welcher der Infektiositätstiter des Ausgangsmaterials mit  $10^{7,0}$   $KID_{50}/0,1$  ml etwas höher lag als in dem vorausgegangenen Versuch, war nach einer Inaktivierungszeit von 52 Stunden im unverdünnten Material noch aktives Virus enthalten. Nach insgesamt 60 Stunden war das Reovirus auch hier vollkommen inaktiviert.

In den Temperatur-Kontrollversuchen sanken die Infektiositätstiter der Reovirus-Suspensionen nur geringgradig ab. Bei  $+4^{\circ}C$  betrug der Titerabfall innerhalb 144 Stunden 0,25 log. Die Einwirkung einer Temperatur von  $+37^{\circ}C$  hatte einmal einen Titerabfall um 1 log innerhalb 52 Stunden, in einem anderen Versuch innerhalb 144 Stunden zur Folge.

In der Abbildung 6 ist der Verlauf der Formalin- und Wärmeinaktivierung des Reovirus Serotyp 1 graphisch dargestellt.

Das Hämagglutinin des Reovirus wurde durch die Formalineinwirkung partiell inaktiviert. Innerhalb 60 Stunden bei  $37^{\circ}C$  führte die Formalinkonzentration 1:1000 zu einem Titerabfall von  $2^{-7}$  auf  $2^{-4}$ .

### 3.2.3      Untersuchungen von Seren ungeimpfter Kontrollmäuse =====              auf das Vorkommen von Reovirus Serotyp 1 - Antikörpern =====

Als Kontrollseren wurden 2 Serumpools von je 10 ungeimpften Mäusen benützt. Es waren in diesen Seren weder hämagglutinationshemmende noch neutralisierende, gegen Reovirus Serotyp 1 gerichtete Antikörper nachweisbar. Die Serumantikörpertiter waren kleiner als 1:4 (HAH-Test) bzw. kleiner als 1:2 (N-Test).

3.2.4      Bildung von humoralen Antikörpern in Mäusen nach  
=====

Impfung mit inaktiviertem Reovirus Serotyp 1  
=====

3.2.4.1    Impfung mit hitzeinaktiviertem Virus

Auf der Basis von hitzeinaktiviertem Reovirus Serotyp 1 (Inaktivierung 15 Sekunden bei 95°C) wurden 3 Versuchsimpfstoffe in Mäusen getestet:

Impfstoff 1 bestand aus inaktiviertem Virus ohne Zusätze, Impfstoff 2 enthielt als Adjuvans  $\text{Al(OH)}_3$ , und Impfstoff 3 enthielt als Adjuvantien  $\text{Al(OH)}_3$  und Saponin. Die Mäuse reagierten weder auf die einmalige Impfung noch auf eine Wiederholungsimpfung mit einer nachweisbaren Bildung humoraler Reovirus Typ 1 - Antikörper. Die Antikörpertiter der Serumpools waren im HAH-Test kleiner als 1:4 und im N-Test kleiner als 1:2.

3.2.4.2    Impfung mit formalininaktiviertem Virus

3.2.4.2.1 Allgemeines

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Versuchsimpfstoffe ist eine Virussuspension verwendet worden, deren Infektiositätstiter  $10^{7,0} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$  war. 1 Impfdosis (0,8 ml Virussuspension) enthielt somit  $10^{7,9} \text{KID}_{50}$  inaktiviertes Virus. Der Hämagglutininintiter betrug vor der Inaktivierung  $2^{-7}$ , nach der Inaktivierung  $2^{-4}$ . Die Inaktivierung lief bei einer Temperatur von 37°C und einer Formalinendkonzentration von 1:1000 ab.

3 in ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Impfstoffe wurden in Mäusen getestet:

Impfstoff 4 bestand aus inaktiviertem Virus ohne Zusätze, Impfstoff 5 enthielt als Adjuvans  $\text{Al(OH)}_3$ , und Impfstoff 6 enthielt als Adjuvantien  $\text{Al(OH)}_3$  und Saponin.

### 3.2.4.2.2 Bildung hämagglutinationshemmender Serumantikörper in Mäusen

Die Applikation aller 3 Versuchsimpfstoffe führte in Mäusen zur Bildung hämagglutinationshemmender Serumantikörper.

Bei der Untersuchung von Seren, die vor Ansetzen des Hauptversuches keiner Inhibitor-Vorbehandlung unterzogen worden waren, erhielten wir folgende Einzelergebnisse.

Nach der Applikation von Impfstoff ohne Adjuvantien (Impfstoff 4) betrug der Antikörpertiter des Serumpools  $2^{-8}$  (21 Tage nach einmaliger Impfung) bzw.  $2^{-9}$  (10 Tage nach der Wiederholungsimpfung). Geringgradig höher lagen die Titer nach der Applikation von Impfstoff, dem als Adjuvans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  zugegeben worden war (Impfstoff 5). Sowohl nach einmaliger wie nach zweimaliger Impfung betrugen die Titer  $2^{-10}$ .

Der Impfstoff 6 (Virus mit Zusatz von  $\text{Al}(\text{OH})_3$  und Saponin) stimulierte die Antikörperbildung am besten: die Serumantikörper erreichten Werte von  $2^{-9}$  nach 1 Impfung und  $2^{-11}$  nach der Wiederholungsimpfung.

Die Untersuchungen von Seren, die vor dem Hauptversuch einer Inhibitorbehandlung unterzogen worden waren, erbrachten sinngemäße Ergebnisse.

Nach der Behandlung mit Heparin-Manganchlorid waren die Ergebnisse mit einer Ausnahme die gleichen wie bei unbehandelten Seren. Lediglich bei Impfstoff 5 lag der Antikörpertiter nach einer Impfung mit  $2^{-9}$  um eine 2er Potenz niedriger als beim entsprechenden unbehandelten Serum.

Seren, die mit Kaolin behandelt worden waren, wiesen gegenüber unbehandelten Seren durchwegs um 1-2 2er Potenzen niedrigere Titer auf. Die gute antigene Wirksamkeit der Impfstoffe zeigte sich aber auch hier deutlich. Der Impfstoff 4 (ohne Adjuvans) stimulierte die Bildung von Antikörpern bis zu Titern von  $2^{-6}$  (1 Impfung) bzw.  $2^{-8}$  (zwei Impfungen). Die Verwendung von  $\text{Al}(\text{OH})_3$  als Adjuvans (Impfstoff 5) führte zu geringgradig höheren Antikörpertitern ( $2^{-9}$ ), während die gleichzeitige Zugabe von  $\text{Al}(\text{OH})_3$  und Saponin (Impfstoff 6)

eine signifikant bessere Wirkung zeigte: die Serumantikörpertiter betrugen  $2^{-8}$  (1 Impfung) und  $2^{-10}$  (2 Impfungen).

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

#### 3.2.4.2.3 Bildung neutralisierender Serumantikörper in Mäusen

Die Impfung der Mäuse mit inaktiviertem Reovirus stimulierte auch die Bildung virusneutralisierender Serumantikörper.

Die Titer neutralisierender Antikörper lagen durchwegs niedriger als die der hämagglutinationshemmenden Antikörper. Außerdem traten die Unterschiede zwischen den 3 verschiedenen Impfstoffen einerseits und die zwischen ein- und zweimaliger Impfung andererseits nicht so deutlich zutage wie bei den hämagglutinationshemmenden Antikörpern. Trotzdem wurde der gleiche Trend sichtbar.

Nach der Impfung mit inaktiviertem Reovirus ohne Adjuvantien (Impfstoff 4) waren die Antikörpertiter  $2^{-6}$  (1 Impfung) bzw.  $2^{-6,75}$  (2 Impfungen). Zu gleichen Resultaten führte die Impfung mit Impfstoff 5 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  - Zusatz). Die höchsten Titer virusneutralisierender Serumantikörper wurden nach der Applikation des Impfstoffes 6 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  - und Saponin-Zusatz) erreicht. Sie waren  $2^{-6,75}$  (einmalige Impfung) bzw.  $2^{-7,25}$  (zweimalige Impfung).

Die Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Antigene Wirksamkeit von formalininaktiviertem  
(1:1000/37°C) Reovirus, Serotyp 1 in Mäusen  
nach subkutaner Verimpfung

| Impfstoff<br>Nr. | Serum            | Serumantikörpertiter ( $-\log_2$ ) |        |                              | N-Test |
|------------------|------------------|------------------------------------|--------|------------------------------|--------|
|                  |                  | H A H - T e s t                    |        |                              |        |
|                  |                  | <u>Serumvorbehandlung</u>          |        |                              |        |
|                  |                  | keine                              | Kaolin | Heparin<br>MnCl <sub>2</sub> |        |
| ---              | Kontrolle 1      | <2                                 | <2     | <2                           | <1     |
|                  | Kontrolle 2      | <2                                 | <2     | <2                           | <1     |
| 4                | nach 1 Impfung   | 8                                  | 6      | 8                            | 6      |
|                  | nach 2 Impfungen | 9                                  | 8      | 9                            | 6,75   |
| 5                | nach 1 Impfung   | 10                                 | 9      | 9                            | 6      |
|                  | nach 2 Impfungen | 10                                 | 9      | 10                           | 6,75   |
| 6                | nach 1 Impfung   | 9                                  | 8      | 9                            | 6,75   |
|                  | nach 2 Impfungen | 11                                 | 10     | 11                           | 7,25   |

#### 4.        B E S P R E C H U N G   D E R   E R G E B N I S S E =====

Die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche machen deutlich, daß Reoviren sowohl gegenüber Hitze als auch gegenüber Formalin sehr resistent sind.

Bei einer Temperatur von 95° C vergingen 15 Sekunden bis zur völligen Inaktivierung des Reovirus Serotyp 1. Auf diese ungewöhnliche Hitzeresistenz der Reoviren machten schon STANLEY, DORMAN und PONSFORD (1954) sowie HULL, MINNER und SMITH (1956, 1958) aufmerksam. In ihren Versuchen mit Suspensionen aus infektiösen Mäusegehirnen blieb der Reovirus-Serotyp 3 bei 56° C nach 2 Stunden und bei 60° C nach 30 Minuten noch infektiös, und bei den Reovirus-Serotypen 1 und 2 reichte eine Temperatur von 65° C nicht aus, um sie innerhalb 30 Minuten vollständig zu inaktivieren. Ein Vergleich dieser Literaturangaben mit den eigenen Ergebnissen ist allerdings wegen der unterschiedlichen Natur des Virusausgangsmaterials nur bedingt möglich.

Die Inaktivierung des Reovirus bei 95° C verlief als Reaktion 2. Ordnung: nach einem anfänglich raschen Rückgang des Infektiositätstiters (Inaktivierungsrate 99,99 % nach 6 Sekunden) vergingen bis zur kompletten Inaktivierung noch weitere 9 Sekunden.

Auch die Inaktivierung des Reovirus Serotyp 3 mit Formalin entsprach einer Reaktion 2. Ordnung. Besonders deutlich wurde dies bei Formalinkonzentrationen von 0,025 % und 0,05 %. Bei der Konzentration von 0,025 % Formalin und einer Temperatur von 37° C war nach 144 Stunden noch infektiöses Virus nachweisbar. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Angaben von HULL, MINNER und SMITH (1956), die bei gleichen Versuchsbedingungen eine Inaktivierungsdauer von nur 96 Stunden angeben. Infektiositätstiter des Virusausgangsmaterials oder virusstamm-spezifische Differenzen können hierbei eine Rolle spielen.

Die Inaktivierungsdauer bei doppelter Formalinkonzentration (0,05 %) war mit 144 Stunden ebenfalls sehr lang, während eine Konzentration von 0,1 % innerhalb wesentlich kürzerer Zeit (52 bzw. 60 Stunden) zum völligen Infektiositätsverlust des Virus führte, wobei eine Zeit von 52 Stunden offensichtlich die untere Grenze der Inaktivierungsdauer darstellt, denn in einem 2. Versuch, bei dem der Infektiositätstiter des Virusmaterials mit  $10^7$  KID<sub>50</sub>/0,1 ml nur um 0,25 log höher lag, war das Reovirus erst nach 60 Stunden völlig inaktiviert.

Betrachtet man die Ergebnisse vorliegender Inaktivierungsversuche hinsichtlich ihrer Eignung für die Herstellung eines Antigenimpfstoffes gegen die Infektion mit Reovirus Serotyp 1, so scheidet von vornherein die Methode der Kurzzeit-Wärmeinaktivierung bei 95° C aus, da bei diesem Verfahren neben der Infektiosität des Virus auch seine Immunogenität völlig verloren ging: in Mäusen, die mit hitzeinaktiviertem Reovirus geimpft worden waren, kam es nicht zu einer nachweisbaren Stimulierung humoraler Reovirusantikörper. Auch nach Zusatz von Adjuvantien zum Impfantigen war keine Antikörperbildung zu beobachten.

Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit der Formalininaktivierung erzielt. Niedrige Konzentrationen des Formalins (0,025 % und 0,05 %) erscheinen jedoch für eine Reovirus-Inaktivierung zum Zweck der Impfstoffherstellung wenig geeignet, da eine Inaktivierungsdauer von 6 und mehr Tagen bei 37° C und ausgeprägtem Reaktionsablauf 2. Ordnung nicht nur die Gefahr in sich birgt, daß Reste von infektiösem Virus erhalten bleiben, sondern auch weil damit zu rechnen ist, daß eine derartige Inaktivierungsmethode wegen der Länge der Inkubierungszeit bei 37° C die Immunogenität des Virus beeinträchtigt.

Eine Untersuchung des mit niedriger Formalinkonzentration (0,025 % und 0,05 %) inaktivierten Reovirus auf seine immunisierenden Eigenschaften unterblieb deshalb.

Die Inaktivierung des Reovirus Serotyp 1 mit Formalin in der Konzentration 0,1 % bei 37° C über 50 - 60 Stunden erwies sich in vorliegenden Untersuchungen für die Herstellung eines Antigenimpfstoffes als gut geeignet: bei völligem Verlust der Infektiosität blieb die immunisierende Eigenschaft des Virus erhalten.

Die Applikation eines auf diese Weise hergestellten Versuchs-impfstoffes führte bei Mäusen zu einer kräftigen Stimulierung der Antikörperproduktion. Durch die Beimischung von Adjuvantien (Aluminiumhydroxyd und Saponin) zum Impfstoff einerseits und mittels einer Wiederholungsimpfung andererseits konnte die Antikörperbildung weiter gesteigert werden.

Die Höhe der Titer hämagglutinationshemmender Serumantikörper war abhängig von der Art der Inhibitor-Vorbehandlung der Seren. Eine solche Vorbehandlung erschien in vorliegenden Versuchen angebracht, nachdem bei Seren nicht vakzinierter Kontrollmäuse in Verdünnungen bis 1:32 eine partielle Hemmung der Reovirus-Hämagglutination beobachtet worden war.

Eine Heparin-Manganchlorid-Behandlung der Seren führte gegenüber den bei unbehandelten Seren erzielten Ergebnissen zu keinen signifikanten Unterschieden, dagegen lagen die Antikörpertiter nach Kaolin-Vorbehandlung regelmäßig um 1 - 2 2er-Potenzen niedriger als bei unbehandelten Seren.

Die höchsten Titer hämagglutinationshemmender Antikörper waren bei den Mäusen nachweisbar, die mit Adjuvantien (Aluminiumhydroxyd und Saponin) präpariertem Impfstoff vakzinert worden waren. Sie betrugen bei unbehandelten und einer Manganchlorid-Behandlung unterzogenen Seren  $2^{-9}$  (einmalige Impfung) bzw.  $2^{-11}$  (zweimalige Impfung).

Die Impfung der Mäuse hatte neben der Bildung von hämagglutinationshemmenden auch die Stimulierung von neutralisierenden Antikörpern zur Folge. Während bei ungeimpften Kontrollmäusen die Antikörpertiter kleiner als 1:2 waren, wiesen die Serum-pools ein- oder zweimal geimpfter Mäuse Titer von  $2^{-6}$  bis  $2^{-7,25}$  auf. Nach zweimaliger Impfung waren die Antikörpertiter

geringgradig, jedoch nicht signifikant höher als nach nur einmaliger Impfung. Die besten Ergebnisse (Antikörpertiter  $2^{-6,75}$  bzw.  $2^{-7,25}$ ) wurden auch hier mit dem Impfstoff erzielt, welcher Aluminiumhydroxyd und Saponin enthielt. Die Titer der neutralisierenden Serumantikörper lagen in allen Fällen niedriger als die der hämagglutinationshemmenden Antikörper. Die Differenzen betrugen bis zu 4 2er-Potenzen, eine Beobachtung, die auch von ROSEN (1964, 1968) beschrieben wurde. Für die praktische Impfstoffprüfung, bei der dem Nachweis neutralisierender Antikörper die größere Bedeutung zukommt, muß dies vor allem dann berücksichtigt werden, wenn bei der Wirksamkeitsprüfung von Reovirus-Impfstoffen die wesentlich einfachere Technik des Hämagglutinationshemmungstestes angewandt wird.

5.           Z U S A M M E N F A S S U N G  
=====

Es wurde versucht, Reovirus Serotyp 1, Stamm "Lang", unter Erhalt seiner immunisierenden Eigenschaften zu inaktivieren.

Die Kurzzeit-Wärmeinaktivierung ( $95^{\circ}$  C, 15 Sekunden) führte zum völligen Verlust der Immunogenität des Virus: nach Applikation des hitzeinaktivierten Reovirus an Mäuse konnte eine Bildung hämagglutinationshemmender und neutralisierender Antikörper nicht nachgewiesen werden.

Die Inaktivierung von Reovirus, Serotyp 1, mit Formalin bei  $37^{\circ}$  C und einem pH-Wert von 7,0 dauerte bei einer Formalinendkonzentration von 0,1 % 52 - 60 Stunden, bei 0,05 %iger Konzentration des Formalins 144 Stunden.

Ein Reovirus Serotyp 1 - Antigenimpfstoff (Formalin 0,1 %,  $37^{\circ}$  C, pH 7,0, 60 Stunden) stimulierte in Mäusen die Bildung hämagglutinationshemmender und neutralisierender Serumantikörper. Durch Beimischung von Adjuvantien (Aluminiumhydroxyd und Saponin) zum Impfstoff und mittels Wiederholungsimpfung wurde die Antikörperproduktion weiter gesteigert.

## S u m m a r y

=====

It was tried to inactivate Reovirus type 1, strain "Lang", under conditions that prevented loss of immunogenic properties.

Heat inactivation ( $95^{\circ}$  C, 15 seconds) lead to a complete loss of immunogenicity of the virus. No antibody production was observed in mice inoculated with the heat inactivated reovirus.

Inactivation with 0,1 % formaldehyde at pH 7,0 was complete after 52 - 60 hours at  $37^{\circ}$  C, at a concentration of 0,05 % the duration of inactivation was 144 hours.

A reovirus type 1 vaccine (formaldehyde 0,1 %;  $37^{\circ}$  C; pH 7,0; 60 hours) induced the formation of hemagglutination-inhibition and neutralizing antibodies in mice. The addition of adjuvants (aluminium hydroxyde and saponin) to the vaccine and a repeated vaccination lead to higher antibody production.

## 6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

1. Abinati, F.R., 1963: Respiratory disease viruses of cattle and observations on reo-virus infections of cattle. Am.Rev.resp.Dis., 88:290
2. Anderer, F.A., 1959: Reversible Denaturierung des Proteins aus Tabakmosaikvirus. Z.Naturforsch.,14b:642
3. Antoniadis, G., and M. Woytek, 1970: Über die Stammspezifität von Seruminhhibitoren. Vergleichende serologische Untersuchungen mit den Influenzavirusstämmen A<sub>2</sub>/Berlin/2/68 und A<sub>2</sub>/Hong Kong/1/68. Zbl.Bakt., I. Orig., 214:186
4. Appleton, G.S., B. Hitchner, und R.W. Winterfield, 1963: A comparison of the immune response of chickens vaccinated with formalin- and beta-propiolactone-inactivated NCD-vaccines. A.J.V.Res., 24:827
5. Bachrach, H.L., 1965: Foot-and-mouth disease virus: structural changes during reaction with cations and formaldehyde as deduced from absorbance measurements. Virology, 25:532
6. Bachrach, H.L., 1966: Progress in Medical Virology, 8:214
7. Bachrach, H.L., S.S. Breese, J.J. Callis, W.R. Hess, and R.E. Patty, 1957: Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. Proc.Soc.exp.Biol. N.Y., 95:147
8. Barry, R.D., 1961: The multiplication of influenza virus. II. Multiplicity reactivation of UV irradiated virus. Virology, 14:398
9. Bauer, K., 1970: Die Inaktivierung und die Antigenität des MKS Virus durch Aethylaethylenimin und die Eignung des inaktivierten Virus zur Impfstoffherstellung. Zbl.Bakt., I.Orig., 213:285
10. Bernheim, F., and G.R. Gale, 1952: Effect of BPL on metabolism of pseudomonas aeruginosa and growth of certain fungi. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 80:163

11. Beukers, R., and W. Berends, 1960: Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochem. Biophys. Acta.*, 41:55
12. Boeyé, A., 1959: Induction of a mutation in poliovirus by nitrous acid. *Virology*, 9:691
13. Bonin, O., 1964: Ein einfaches Verfahren zur Schätzung der mittleren wirksamen Dosis bei Virustitrationen (dim) und Serumtitrationen (dem) nach der Formel von Spearman-Kärber. Vortragsmanuskripte Biometr.Sem.f. Virologen, BFA Viruskrankh.d.Tiere, Tübingen.
14. Borgert, K., K. Koschel, H. Tauber, and E. Wecker, 1971: Effect of inactivation by hydroxylamine on early functions of poliovirus. *J. Virol.*, 8:1
15. Borsa, J., and A.F. Graham, 1968: RNA polymerase activity in purified virions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 33:395
16. Böttiger, M., E.Lycke, B. Melén, and G. Wrangé, 1958: Inactivation of poliomyelitisvirus by formaldehyd. Incubation time in tissue culture of formalin treated virus. *Arch.Virusforsch.*, 8:259
17. Brown, D.M., and P. Schell, 1951: The reaction of hydroxylamine with cytosine and related compounds. *J.Mol.Biol.*, 3:709
18. Brown, F., Cartwright, and D.L. Stewart, 1963: The effect of various inactivating agents on the viral and ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease virus and its attachment to susceptible cells. *J.Gen.Microbiol.*, 31:179
19. Buening, G.M., and J.B. Gratzek, 1967: Comparison of selected characteristics of from strains of infectious bovine rhinotracheitis virus. *A.J.V.Res.*, 28:1257
20. Cameron, K.R., 1973: Ultraviolet irradiation of herpes simplex virus: Action spectrum for the survival of infectivity in relation to the small-plaque effect. *J.Gen.Virol.*, 18:51
- Cary, R.I., and H. Koprowski, 1962: Mutation of type 3 poliovirus with nitrous acid. *Virology*, 17:99

22. Cartwright, T.E.,  
A.E. Ritchie and  
M.A. Lauffer, 1956:  
The reaction of tobacco mosaic virus  
with formaldehyd. III. Kinetics of  
the loss of infectivity.  
Virology, 2:689
23. Ciaccio, G., 1964:  
Evaluation by means of the neutrali-  
zation test in mice of the serological  
specificity of FMDV (type C and A<sub>7</sub>)  
reisolated from mice inoculated  
with virulent material treated with  
nitrous acid and phenol.  
Ann.Inst.Pasteur, 106:485
24. Clegg, F.C., J.I.H.  
Phillip, and  
G.J. Halliday, 1972:  
The use of killed vaccines in the  
control CF virus pneumonia of calves.  
VII. Internationale Tagung Rinder-  
krankh., London.
25. Cole, F.E.Jr., 1971:  
Inactivated eastern equine encephalo-  
myelitis vaccine propagated in  
rolling bottle cultures of chick  
embrio cells.  
Appl. Microbiol., 22:842
26. Csonka, E., and  
A. Koch, 1962:  
Effects of formaldehyde on influenza  
virus. III. Effects on the virus as  
an antigen.  
Acta microb.Acad.Sci.Hung., 9:89
27. Davidson, A.P., and  
D. Stone, 1972:  
A multivalent calf virus pneumonia  
vaccine.  
VII Internat. Tagung Rinderkrankh.,  
London.
28. Dilovski, M., 1969:  
Über die UV-Inaktivierung des  
Aujeszki Virus.  
Zbl.Vet.Med. B., 16:346
29. Dilovski, M., 1970:  
Versuche zur Photoreaktivierung der  
UV-inaktivierten Formen des Aujeszki  
und NCD.  
Zbl.Vet.Med. B., 17:850
30. Dilovski, M., 1972:  
Der Einfluß der ionisierenden Bestrah-  
lung auf Tierviren. I. Gamma-Inaktivie-  
rung des Aujeszki-Virus.  
Zbl.Vet.Med., 19:128
31. Dimopoulos, G.T.,  
O.N. Fellowes,  
J.J. Callis, G.C. Pop-  
pensiak, A.G. Edwards  
and J.H. Graves, 1959:  
Thermal inactivation and antigenicity  
studies of heated tissue suspensions  
containing foot-and-mouth disease  
virus.  
Am.J.Vet.Res., 20:510
32. Dougherty, R.M., 1961:  
Heat inactivation of rous sarcoma  
Virology, 14:371

33. Drees, V.O., 1965: Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen.  
(Haas und Vivell eds.). S.241  
J.F. Lehmanns Verlag - München.
34. Dutscher, R.M., R.B. Read and W. Litsky, 1960: zit. nach Mayr, A., 1962.  
Monografie, München.
35. Engler, R. und G.Schramm, 1970: Die Bildung der infektiösen Ribonucleinsäure während der Vermehrung des Tabakmosaikvirus.  
Naturforsch., 15B: 38
36. Fellowes, O.N., 1965: Comparison of the inactivation and antigenicity of foot-and-mouth disease virus by acetyleneimine and by combined effect of UV.light and BPL.  
J.Immunol., 95:1100
37. Fellowes, O.N., 1966: Hydroxylamine as an inactivating agent for foot-and-mouth virus.  
J. Immunol., 96:772
38. Ferme, C., 1907: Über die Immunisierung gegen Wutkrankheit.  
Z.Hyg.Infek.Krankh., 58:233
39. Fernelius, A.L., L.G. Classick, and R.L. Smith, 1972: Evaluation of BPL-inactivated and chloroform-treated-virus vaccines against bovine viral diarrhea-mucosal disease.  
A.J.Vet.Res., 33:1421
40. Fraenkel-Conrat, H., 1954: Reaction of nucleic acid with formaldehyde.  
Biochim.Biophys.Acta, 15:308
41. Fraenkel-Conrat, H., 1969: The Chemistry and Biology of Viruses.  
Academic Press - New York and London.
42. Fraenkel-Conrat, H., and H.S. Olcott, 1948: The reaction of formaldehyde with proteins. V. Crosslinking between amino and amide or guanidyl groups.  
J.Am.Chem.Soc., 70:2673
43. Fraenkel, T., and J.E. Dahl, 1948: A simplified procedure for the concentration and purification of influenza virus.  
Science, 96:499
44. Fraenkel, T., and J.E. Dahl, 1948: Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of ribonucleic acid.  
Nature, 164:343

45. Freese, E., E. Bautz, and E. Bautz-Freese: 1961a: The chemical and mutagenic specificity of hydroxylamine. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 47:845
46. Freese, E., E. Bautz-Freese, and E. Bautz, 1961b: Hydroxylamine as a mutagenic and inactivating agent. J.Mol.Biol., 3:133
47. French, G.R., and R.W. McKinney, 1964: Use of BPL. in preparation of inactivated arbovirus serologic test antigens. J.Immunol., 92:772
48. Frenkel, H.S., 1951: Research on foot-and-mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explanations of bovine tongue epithelium. Am.J.Vet.Res., 12:187
49. Frescura, T., A.Fiorini, and A. Baldoni, 1972: Inattivazione dei virus aftosi con etiletilenimina e preparazioni dei vaccini, monovalenti e trivalenti, per la immunizzazioni dei suini. Arch.Vet.Ital., 23:241
50. Furminger, I.G.S., and A.W. Marrow, 1969: Testing of vaccines for avian leucosis viruses. Progr.immunobiol.Standard., 3:215
51. Furuse, K., and I. Watanabe, 1971: Effects of ultraviolet irradiation on RNA phages in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. Virology, 46:171
52. Gale, G.R., 1953: The effect of BPL. on the metabolism of blastomyces dermatitidis. J.Bact., 65:505
53. Gard, S., 1956: Proceedings of the 2. International Congress on Immunemicrobiologic Standartization, Rome. zit. nach Gard and Lycke, 1957.
54. Gard, S., and Lindholm, 1947: zit. nach Bingel, K.F. (Die Experimentelle Virusdesinfektion, 1957. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig)
55. Gard, S., and E. Lycke, 1957: Inactivation of poliovirus by formaldehyde. Analysis of inactivation curves. Arch.Ges. Virusforsch., 7:471
56. Gard, S., and O. Maaloe, 1959: Inactivation of viruses. The Viruses, Vol. 1, S.100 (Burnet and Stanley eds., Academic Press, N.Y. - London).
57. Gerber, P., 1962: An infectious desoxyribonucleic acid derived from vacuolating virus (SV-40). Virology, 16:96

58. Ghendon, Y.Z., 1963: Mutations of virulent and attenuated poliovirus strains induced by nitrous acid.  
Acta Virol., 7:16
59. Gierer, A., und G. Schramm, 1956: zit. nach Schramm, G., Zbl.Bakt. I.Orig., 184:96, 1962.
60. Gierer, A., and K.W. Mundry, 1958: Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid in vitro.  
Nature, 182:1457
61. Gill, E., J.F. Sullivan, H.D. Stone, and A.S. Hundemann, 1959: Role of adjuvants in immunogenicity of killed NCD-vaccines.  
Am.J.Vet.Res., 20:357
62. Goldstein, M.A., and N.M. Tauraso, 1970: Effect of formalin, BPL., merthiolate and UV light upon influenza virus infectivity, chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity.  
Applied Microbiol., 19:290
63. Granoff, A., 1961: Induction of NCD-virus mutants with  $\text{HNO}_2$ .  
Virology, 13:402
64. Graves, J.H., 1963: Formaldehyde inactivation of FMD-virus as applied to vaccine preparation.  
A.J.Vet.Res., 24:1131
65. Graves, J.H., and R.B. Arlinghaus, 1967: Acetyletyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth-disease vaccines.  
Proc.of the 71st.An.Meeting. U.S. Liv. Sanit. Ann., S.397
66. Graves, J.H., P.D. McKercher, and J.J. Callis, 1972: Foot-and-mouth disease vaccine: Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease.  
A.J.Vet.Res., 33:765
67. Gresham, T.L., J.E. Jansen, F.W. Shaver, and J.T. Gregory, 1948: zit. nach Lo Grippo, G.A. and F.W. Hartmann.  
J.Immunol., 75:123
- Gresham, T.L., J.E. Jansen, F.W. Shaver, H.R. Frederick, F.T. Fiedorck, R.A. Bankert, J.T. Gregory, and W.L. Becars, 1952: zit. nach Lo Grippo, G.A. and F.W. Hartmann.  
J.Immunol., 75:123

68. Haas, R., 1962: Inaktivierung als Problem der Impfstoffherstellung.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 184:119
69. Haas, R., L. Körner, V. Dostal und H. Schweinsberg, 1957: Über die Inaktivierung von Polio-myelitisviren mit Formaldehyde.  
Z.Hyg., 143:490
70. Haas, R., R. Thomssen, V. Dostal und E. Ruschmann, 1960: Untersuchungen zum Mechanismus der Formaldehyd-Inaktivierung von Polio-myelitisviren.  
Arch.Virusforsch., 9:470
71. Hartley, J.W., P. Rowe, and R.J. Huebner, 1961: Recovery of reoviruses from wild and laboratory mice.  
Proc.Soc.exp.Biol., 108:390
72. Hartmann, F.W., S.L. Piepes, and A.M. Wallbank, 1951: Virucidal and bactericidal properties of BPL.  
Fed.Proc., 10:358
73. Heiken, K. und G. Spicher, 1962: Mechanismus der reversiblen und irreversiblen Inaktivierung von Mikroorganismen.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 184:105
74. Hiatt, C.W., 1964: Kinetics of the inactivation of viruses.  
Bac.Rev., 28:150
75. Hollaender, A., and B.M. Dugar, 1936: zit. nach Gard and Maaloe, Vol.I, S.359  
The Viruses (Burnet and Stanley, eds.). Academic Press, N.Y. - London, 1959.
76. Hollaender, A., and J.W. Oliphant, 1944: zit. nach Gard and Maaloe, Vol.I, S.359  
The Viruses (Burnet and Stanley, eds.). Academic Press, N.Y. - London, 1959.
77. Hull, R.N., J.R. Minner, and J.W. Smith, 1956: New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells.  
I. Origin and properties of cytopathogenic agents, SV.1, SV.2, SV.4, SV.5, SV.6, SV.11, SV.12 and SV.15.  
Amer.J.Hyg., 63:204
78. Hull, R.N., 1968: The Simian Viruses.  
Virology Monographs (2), S.2.  
Springer-Verlag, Wien - New York.
79. Hull, R.N., J.R. Minner, and C.C. Mascoli, 1958: New viral agents from tissue cultures of monkey kidney cells. III. Recovery of additional agents both from tissues and excreta.  
Amer.Journ.Hyg., 68:31

80. Hyslop, N.G., and A.W. Marrow, 1969: The influence of aluminium hydroxid content, dose volume and the inclusion of saponin on the efficacy of inactivated FMD-vaccines. Res.Vet.Sci., 10:109
81. Ikegami, N., and P.J. Gomatos, 1972: Inhibition of host and viral protein syntheses during infection at the nonpermissive temperature with mutants of reovirus 3. Virology, 47:306
82. Ivanicova, S., S.Skoda, V.Mayer and F. Sokol, 1963: Inactivation of Aujeszki disease (pseudorabies) virus by nitrous acid. Acta Virol., 7:7
83. Johnson, C.D., 1965: Direct X-ray inactivation of the viruses of Teschen and taifon disease, FMD and vesicular stomatitis. Nature, 207:37
84. Kapular, A.M., N. Mendelsohn, H. Klett, and G. Acs, 1970: Four basespecific nucleoside 5-triphosphatases in the subviral core of reovirus. Nature, 225:1209
85. Kelloff, G.A., A.Stuart, and R. Gilden, 1970: Inactivation of murine sarcoma and leukemia viruses by UV.irradiation. Virology, 42:1133
86. Kelly, A.R., 1952: Effects of virucide BPL and its degradation products on blood platelets. Fed.Proc., 11:419
87. Kelly, A.R., and F.W. Hartman, 1952: Biological effects of BPL. Fed. Proc., 11:419
88. Knight, C.A., 1963: Protoplasmalogia. Band IV, Chemistry of Viruses. Springer-Verlag, Wien.
89. Koch, G., 1962: Über die Hitzeinaktivierung von Polioviren und isolierter Poliovirusnucleinsäure. Zbl.Bakt. I.Orig., 184:165
90. Kolar, J.R., I.L. Shechmeister, and W.G. Kommlade, 1963: Use in cattle of formalin-killed polyvalent vaccine with adjuvant against IBR, BVD, and PI.3 viruses. Am.J.Vet.Res., 33:1415
91. Kolar, J.R., I.L. Shechmeister, and W.G. Kommlade, 1963: Studies on myxovirus PI.3 virus and prevention of shipping fever. J.A.V.M.A., 142:881

92. Kundin, W.D., C. Liu,  
and J. Gigstad, 1966: Reovirus infection in suckling mice:  
immunofluorescent and infectivity  
studies.  
J.Immunology, 97:393
93. Lamont, P.H., 1968: Reoviruses.  
J.A.V.M.A., 152:807
94. Lamont, P.H., J.H.  
Darbyshire, P.S.Dawson,  
A.R. Omar, and A.R.  
Jennings, 1968: Pathogenesis and pathology of  
infection in calves with strains of  
reovirus types 1 and 2.  
J.Comp.Pathol., 78:23
95. Lancaster, J.E., 1964: Newcastle disease-control by vaccination.  
Veterinary Bull., 34:57
96. Lépine, P., P.Atanasiu,  
1956: zit. nach Ubertini, B., G.Nardeli,  
D. Cessi, 1957.  
Schw.Arch.Tierheilk., 99:309
97. Lippelt, H., C.C.  
Schneider und  
F.Winkelmann, 1966: Fragen der Pathogenität von Reoviren  
bei Babymäusen.  
Z.Med.Mikrobiol. und Immunol., 152:280
98. Lo Grippo, G.A., and  
F.W. Hartmann, 1955: Antigenicity of BPL-inactivated virus  
vaccines.  
J.Immunol., 75:123
99. Loh, P.C., and H.K.Oie,  
1969: Growth characteristics of reovirus  
type 2: UV light inactivated virion  
preparations and cell death.  
Arch.Virusforsch., 26:197
100. Lycke, E., 1958a: Studies of the inactivation of polio-  
myelitis virus by formaldehyde. The  
effect upon the rate of inactivation  
of temperature, pH and concentration  
of formaldehyde.  
Arch.Virusforsch., 8:267
101. Lycke, E., 1958b: Studies of the inactivation of polio-  
myelitisvirus by formaldehyd. Inacti-  
vation of partially purified virus  
material and the effect upon the rate  
of inactivation by addition of glycine.  
Arch.Virusforsch., 8:23
102. Macleod, A.J., and  
K. Beckenham, 1965: Vaccination against avian encephalo-  
myelitis with a BPL inactivated  
vaccine.  
Vet.Rec., 77:335
103. Mack, W.N., and  
A. Chotisen, 1955: BPL as a virus altering agent for  
NCD vaccine.  
Poult.Sci., 34:1010

104. Mack, W.N., and A. Chotisen, 1956: Serological response in chickens to BPL-treated NCD-virus. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 91:288
105. Mann, J.J., R.D. Rossen, J.R. Lehrich and J.A. Kasel, 1967: The effect of kaolin on immunoglobulins: an improved technique to remove the nonspecific serum inhibitor of reovirus hemagglutination. J.Immunol., 98:1136
106. Mason, P., and J.C. Griffith, 1964: Crosslinking of fibrous protein by formaldehyde. Nature, 203:484
107. Mayr, A., 1958: Ein Gewebekulturimpfstoff gegen die ansteckende Schweinelähmung. Zbl.Bakt. I.Orig., 172:465
108. Mayr. A., 1962: Immunität, Immunisierung und Impfstoffe bei der Maul- und Klauenseuche. Monografie, München.
109. Mayr, A., K.Strohmaier und R. Lorenz, 1961: Veränderung chemisch-physikalischer Eigenschaften des Virus der ansteckenden Schweinelähmung (Teschen Krankh.) während des Modifizierungsprozesses durch Dauerpassagen in Schweinenierenkulturen. Arch.Virusforsch., 11:183
110. Mayr, A., J.Ringseisen, G. Balyer, B. Bibrack, J. Wallner, und H.Zimmer, 1969: Untersuchungen über Art, Umfang und Ursachen von Impfschäden nach der MKS-Schutzimpfung in Bayern in den Jahren 1967/68. Zbl.Vet.Med. B, 16:32
111. McClelland, L., B. Hampil, V.V.Hamparian, L.Potash, A. Ketler and M.R. Milleman, 1961: II. Development and appraisal of potency of SF-4 virus vaccine. J.Immunol., 87:134
112. McLaren, A.D., and D. Shugar, 1964: Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids. Pergamon Press: the Macmillan Co. N.Y.
113. ... .. T., Z. Hidaka and I. Watanabe, 1963: Fractionation of infectious ribonucleic acid isolated from tobacco mosaic virus. Virology, 19:140
114. Mundry, K.W., 1959: The effect of nitrous acid on tobacco mosaic virus: Mutation, non selection. Virology, 11:11

115. Musgay, M., G.H.Bergold, E. Weiland and S. Vebershär, 1972: Preparation and evaluation of inactivated VEE-vaccines. Zbl.Vet.Med., 19:511
116. Newlin, G.E., and R.N. Bussel, 1972: Inactivation by hydroxylamine and N-methylhydroxylamine of representative myxoviruses and paramyxoviruses. Arch.Virusforsch., 39:303
117. Norman, A., 1960: Ultraviolet inactivation of poliovirus ribonucleic acid. Virology, 10:384
118. Norman, A., and R.C. Veomett, 1960: Heat inactivation of poliovirus RN. Virology, 12:136
119. Orth, G., P.Atanasiu, M. Boiron, J.P.Rebiere and C. Paoletti, 1964: Infectious and oncogenic effect of DNA extracted from cells infected with polyoma virus. Proc.Soc.exp.Biol. N.Y., 115:1090
120. Papaevangelou, G.J., and J.S. Youngner, 1961: Thermal stability of ribonucleic acid from poliovirus mutants. Virology, 15:509
121. Pay, T.W.F., R.C.Telling, B.L. Kitchener and J. Southern, 1971: Some observations on foot-and-mouth disease virus inactivation with acethylethyleneimine (AEI). FMD.Bull., 11:5
122. Pedreira, F.A. and N.M. Tauraso, 1969: Effect of BPL, UV-irradiation, and formalin on Sendai virus cell-fusion factor. Arch.Virusforsch., 28:361
123. Pfefferkorn, E.R., C. Rutstein, and B.W. Burge, 1965: Photoreactivation of pseudorabies virus. Virology, 27:457
124. Pfefferkorn, E.R., and H.M. Coady, 1968: Mechanism of photoreactivation of pseudorabies virus. J.Virology, 2:474
125. Phillip, J.I.H., 1970: Virus pneumonia in calves. Vet.Rec., 86:280
126. Pilchard, E.I., 1967: Experimental inactivated virus hog cholera vaccines: indution period of immunity. A.J.Vet.Res., 28:915
127. Reda, I.M. und A.A.S. Ahmed, 1967: Über das Verhalten von NCD-Virusstämmen verschiedener Pathogenität gegenüber Äther- und Hydroxylamin-Behandlung. Zbl.Vet.Med. B, 14:657

128. Restle, H., W.Hennessen and W. Schäfer, 1962: Behavior of antigenic and other biological properties of types of viruses pathogenic to man and animals, during treatment with nitrous acid. Z.Naturforsch., 17B:228
129. Rhim, J.S., K.O. Smith and J.L. Melnick, 1961: Complete and coreless form of reovirus (ECHO 10). Ratio of number of virus particles to infective units in the one-step growth cycle. Virology, 15:428
130. Rosen, L., 1960: Serologic grouping of reovirus by hemagglutination-inhibition. Am.J.Hyg., 71:242
131. Rosen, L., 1963: Respiratory enterovirus and reovirus infections. Arch.Virusforsch., 13:272
132. Rosen, L., 1964: Reoviruses. Diagnostic procedures of viral and rickettsial disease (Lanette and Schmidt eds.), S. 259
133. Rosen, L., 1968: Reoviruses. Virology Monographs, Springer-Verlag, Wien, Bd. 1
134. Rosen, L., and F.R. Abinati, 1960: Natural and experimental infection of cattle with human types of reoviruses. Am.J.Hyg., 71:250
135. Rosen, L., F.R. Abinati and J.F. Hovis, 1963: Further observations on the natural infection of cattle with reoviruses. Am.J.Hyg., 77:38
136. Ross, L.J.N., K.R. Cameron, and P. Wildy, 1972: Ultraviolet irradiation of herpes simplex virus: reaction processes and delay in virus multiplication. J.Gen.Virol., 16:299
137. Rott, R., and W. Schäfer, 1962: Hydroxylamin-empfindlichkeit des NCD-virus. Z.Naturforsch., 12:861
138. Rowland, D.C., D.N. Sencer and J. Smith, 1970: Stabilizing the immunizing antigen of foot-and-mouth disease virus by fixation with formaldehyde. Arch.Virusforsch., 39:274
139. ... 1970: Viral vaccines in veterinary medicine. Vet.Bull., 40:73

140. Sabin, A.B., 1959: Reoviruses: A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10, is described. Science, 130:1387
141. Salk, J.E., 1959: Viral and Rickettsial Infections of Man. (Thomas, M.R. and Horsfall, L.F., eds.) Pitman Med.Publ.Co.Ltd. - London.
142. Salk, J.E., U. Krech, J.S. Youngner, L.B. Bennet, L.J. Lewis and P.L. Bazeley, 1954: Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. Am.J.Pub.Health, 44:563
143. Salk, J.E., and Gori, J.B., 1960: A review of theoretical, experimental, and practical considerations in the use of formaldehyde for the inactivation of poliovirus. Ann.N.Y.Acad.Sci., 83:609
144. Schäfer, W., T. Zimmermann und H. Schuster, 1959: Inaktivierung verschiedener menschen- und tierpathogener Virusarten sowie des Tabakmosaik-Virus durch salpetrige Säure. Z.Naturforsch., 14B:632
145. Schäfer, W. und R. Rott, 1962: Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Z.Hyg.Infektionskrankh., 148:256
146. Schmidt, N.J., J. Dennis, H.N. Hoffman und E.H. Lenette, 1964: Inhibitors of echovirus and reovirus hemagglutination. II. Serum and phospholipid inhibitors. J.Immunol., 93:377
147. Schramm, G., 1962: Vorgänge bei der Abtötung und Mutation von Viren. Zbl.Bakt. I.Orig., 184:96
148. Schramm, G., G. Schumacher, and W. Zillig, 1955: zit. nach Schramm, G., 1962.
149. Schultz, P., W.A. Rhightsel, E.A. Timm, A.R. Taylor, and I.W. McLaren, 1957: Partially inactivated poliomyelitis-virus for the preparation of vaccines. J.Immunol., 79:297
150. Schuster, H., 1961: The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine. J.Mol.Biol., 3:447

151. Schuster, H. und G. Schramm, 1958: Bestimmung der biologisch wirksamen Einheit in der Ribonucleinsäure des TMV auf chemischem Weg. Z.Naturforsch., 13B:697
152. Schuster, H., and H.G. Wittmann, 1963: The inactivating and mutagenic action of hydroxylamine on tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology, 19:421
153. Sehgal, O.P., and M.M. Soong, 1972: Reaction of nitrous acid viral nucleic acids in situ. Virology, 47:239
154. Sehgal, O.P., 1973: Inactivation of southern bean mosaic virus and its ribonucleic acid by nitrous acid and UV light. J.Gen.Virology, 18:1
155. Setlow, R.B., 1968: Photochemistry, photobiology and repair of polynucleotides. zit. nach Fraenkel-Conrat, H. 1969 The Chemistry and Biology of Viruses.
156. Sever, J.L., 1962: Application of microtechnique to viral serological investigations. J.Immunol., 88:320
157. Shatkin, A.J., and J.D. Sipe, 1968: RNA polymerase activity in purified reoviruses. Proc.Nat.Acad.Sci., 61:1462
158. Shechmeister, I.L., T. Aeschliman, and W.G. Kamlade Jr., 1967: Use of sodium alginate adjuvant in immunization against equine influenza. Am.J.Vet.Res., 28:1373
159. Shefki, M.D., and W.P.J. Bengel, 1969: A trivalent vaccine against virus pneumonia in calves. Vet.Rec., 85:582
160. Siegel, A., 1960: Studies on the induction of tobacco mosaic virus mutants with nitrous acid. Virology, 11:156
161. Sime, E.H., and H.S. Bedson, 1973: Untersuchungen über die Wirksamkeit inaktivierter Geflügelpestvaccinen. Berl.Münch.Tierärz.Wschr., 5:92
162. Sime, E.H., and H.S. Bedson, 1973: A comparison of UV action spectra for vaccinia virus and T.2 bacteriophage. J.Gen.Virology, 18:55
163. Singh, K.V., and D.A. Osman, 1967: Inactivation of rinderpest and ECBO viruses by hydroxylamine. J.Gen.Virology, 11:478

164. Skoda, R. und G. Wittmann, 1972: Die Immunisierung von Schweinen mit Vakzinen aus aktiviertem Aujeszki-Virus.  
Im Druck.
165. Stanley, N.F., 1961: Relationship of hepatoencephalomyelitis virus and reovirus.  
Nature, 189:687
166. Stanley, N.F., D.C. Dorman and J. Ponsford, 1953: Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepatoencephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice.  
Austral.J.exp.Biol., 31:147
167. Stanley, N.F., D.C. Dorman and J. Ponsford, 1954: Studies on the hepato-encephalomyelitis virus (HEV).  
Austr.J.exp.Biol., 32:543
168. Stanley, N.F., and P.J. Leak, 1963: The serologic epidemiology of reovirus infection with special reference to the nottnest island Quokka (Setonix brachyurus).  
Am.J.Hyg., 78:82
169. Starlinger, P., 1955: zit. nach Schramm, G., 1962.
170. Strohmaier, K. und E. Geiß, 1960: Die Inaktivierung des Virus der MKS durch monochromatisches UV Licht.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 180:166
171. Strohmaier, K., 1963: Vergleichende Untersuchungen der infektiösen RNA des Virus der ansteckenden Schweinelähmung (Teschen Krankh.) mit hochmolekularer Gewebe-RNA.  
Z.Naturforsch., 18B:788
172. Stur, O., 1958: Zur Kinetik der Virusinaktivierung durch Formaldehyd.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 173:1
173. Subasinghe, H.A., and P.C. Loh, 1972: Reovirus citotoxicity: Some properties of the UV-irradiated reovirus and its capsid proteins.  
Arch.Virusforsch., 39:172
174. Sullivan, J.F., E. Gill and A.M. Somer, 1958: Immune response of chickens to BPL killed NCD vaccines.  
Am.J.Vet.Res., 19:483
175. Thein, P., 1973: Unveröffentlichte Ergebnisse.
176. Thiry, L., 1963: Chemical mutagenesis of NCD-virus.  
Virology, 19:225

177. Thomssen, R., V. Dostal, Untersuchungen zur thermischen Resistenz von Polioviren. R. Haas und E. Ruschman, Arch.Virusforsch., 9:57 1959:
178. Timm, E.A., J.W.McLean, The nature of formalin inactivation of poliomyelitis virus. C.H. Kupsky und A.E. Hoole, 1956: J.Immunol., 77:444
179. Toht, B., 1971: Experiments on the mode of spreading of Marek's disease virus. Ref.Exp.Med. 2.8, Abstr. 3121
180. Trainor, P.D., S.B. Mohanty and F.M. Hetrick, 1966: Experimental infection of calves with reovirus type 1. Am.J.Epidem., 83:217
181. Traub, E., 1941: Aktive Immunisierung gegen die ansteckende Schweinelähmung mit Adsorbatimpfstoff. Arch.Wiss.Prakt.Tierheilkunde, 77:52
182. Traub, E., 1943: Über einen Adsorbatimpfstoff zur aktiven Immunisierung gegen die atypische Geflügelpest. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr., 718:39
183. Tribe, G.W., A.D. Kanarek and J.B.Kerry, A combined bovine parainfluenza and adenovirus vaccine. 1969: Vet.Rec., 84:299
184. Ubertini, B., G.Nardelli and D. Cessi, 1957: Studies on the inactivation of FMD-virus and NCD-virus with BPL and formaldehyde. Schw.Arch.Tierheilk., 99:309
185. Van Tangeren, H.A.E., 1957: A familial infection with hepat-encephalomyelitis virus in the Netherlands. Study and some properties of the infective agent. Arch.Virusforsch., 7:429
186. Vielmetter, W. und H. Schuster, 1960: Die Basenspezifität bei der Induktion von Mutationen durch salpetrige Säure in Phagen T.2. Z.Naturforsch., 15B:304
187. Waldmann, O., 1938: Die aktive Immunisierung gegen MKS. Berl.Tierärztl.Woch., S.685.

189. Wesslén, T. and Z. Dinter, 1957: The inactivation of FMD-virus by formalin.  
Arch.Virusforsch., 7:394
190. White, A., S. Bermain and J.P. Lowenthal, 1971: Inactivated EEE.vaccines prepared in monolayer and concentrated suspensions chick embryo cultures.  
Ref.Exp.Med. 2.7, Abstr. 2499
191. Wiktor, T.J., M.V. Fernandes, and H. Koprowski, 1964: Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain Wi-38.  
J.Immunol., 93:353
192. Wiktor, T.J., F.Sokol, E. Kuwert, and H. Koprowski, 1969: Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 131:799
193. Wittmann, G., 1967: Inaktivierung des MKS-Virus.  
Schw.Arch.Tierheilk., 109:313
194. Wittmann, G., 1970: Die Verwendung von DEAE-D als Adjuvans bei der Immunisierung von Meerschweinchen mit inaktiviertem MKS-Virus.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 213:1
195. Wittmann, G., 1972: Immunity and immunisation against FMD-virus.  
Berl.Münch.Tierärztl.Woch., 85:281
196. Wittmann, G. und K. Bauer, 1968: Abweichungen von einer Reaktion erster Ordnung bei der Inaktivierung von MKS Virus durch Hydroxylamin.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 207:259
197. Wittmann, G., K.Bauer und M. Musgay, 1970 a: Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit monovalenten Ethyl-ethylenimin (EEI) Diäthylaminoäthyl-dextran (DEAE-D) Vakzinen gegen MKS. vom Virustyp A und C.  
Zbl.Vet.Med., 17B:1058
198. Wittmann, G., K.Bauer und M. Musgay, 1970 b: Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktiviertem MKS-Virus. II. Versuche mit EEI-inaktiviertem Virus und DEAE-D als Adjuvans.  
Arch.Virusforsch., 29:139
199. Wittmann, G., K.Bauer und M. Musgay, 1970 c: Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit einer EEI/DEAE-D Vakzine gegen MKS vom Virustyp A und C.  
Zbl.Vet.Med., 17B:1058

200. Wittmann, G., K.Bauer  
und M. Musgay, 1971: Versuche zur Schutzimpfung von  
6 bis 8 Wochen alten Ferkeln mit  
EEI/DEAE-D Vakzinen gegen MKS vom  
Virustyp O-1.  
Zbl.Vet.Med., 18:135
201. Wittmann, G., K.Bauer  
und M. Musgay, 1972: Experiments on vaccination of pigs  
with EEI/DEAE-D foot-and-mouth  
disease vaccines. Influence of route  
of inoculation and dose of antigen  
on the duration of immunity.  
Arch.Virusforsch., 36:251
202. Wizigmann, G., 1971: Unveröffentlichte Ergebnisse.
203. Wizigmann, G., und  
G. Reinhart, 1971: Untersuchungen über Reovirus-Infektionen  
beim Rind in der Bundesrepublik  
Deutschland.  
Zbl.Vet.Med., 18B:564
204. Wöese, C., 1960: Thermal inactivation of animal viruses.  
Ann.N.Y.Acad.Sci., 83:4
205. Wunderlich, P.M., 1972: Serologische Untersuchungen über das  
Vorkommen und die Verbreitung von  
Reovirusinfektionen in Bayerischen  
Schweinebeständen.  
Vet.Med.Dissert., München.
206. Youngner, J.S., 1956: Thermal inactivation studies with  
different strains of poliovirus.  
J.Immunol., 78:282
207. Zelle, M.R., and  
A. Hollaender, 1954: Monochromatic UV action spectra and  
yields for inactivation of T-1 and  
T-2 escherichia coli bacteriophages.  
J.Bacteriol., 68:210
208. Zisch, H.R.,  
H. Lohr und G. Spira,  
1971: Local immunological response to  
immunization with inactivated  
NCD-virus.  
J.Immunol., 107:1180
209. Brown, F., and  
J. Crick, 1958: Application of agar gel precipitin  
tests to the study of the virus of  
foot-and-mouth disease.  
Virology, 5:133
210. Levy, M., und  
Silbermann, 1937: zit. nach Heiken, K. und G. Spicker,  
1962.  
Zbl.Bakt. I.Orig., 184:105
211. Musgay, M., 1973: Teilnehmende bei der Entwicklung von  
Impfstoffen gegen Virusinfektionen  
der Haustiere.  
Berichte 10. Kongress der DVG,  
Bad Nauheim.

212. Rosen, L., J.F. Hovis, F.M. Mastrotta, J.A. Bell and R.J. Huebner, 1960a: Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family. Amer.J.Hyg., 71:258
213. Rosen, L., J.F. Hovis, F.M. Mastrotta, J.A. Bell and R.J. Huebner, 1960b: An outbreak of infection with type 1 reovirus among children in a institution. Amer.J.Hyg., 71:266
214. Rosen, L., H.E. Evans and A. Spickard, 1963: Reovirus infection in human volunteers. Amer.J.Hyg., 77:29
215. Staehelin, M., 1959: Inactivation of virus nucleic acid with glyoxal derivatives. Biochim.biophys.Acta, 31:448
216. Staehelin, M., 1960: Chemical modifications of virus infectivity: Reactions of tobacco mosaic virus and its nucleic acid. Experientia, 16:473

## LEBENS LAUF

=====

Am 28. April 1941 wurde ich, Telmo Vidor, als vierter Sohn des Angelino Victorio Vidor und der Maria Bianchese Vidor in Osório / Rio Grande do Sul / Brasilien geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Grundschule in Osório, von 1954 bis 1955 das Theologische Gymnasium in Pelotas und von 1956 bis 1959 die Staatliche Landwirtschaftsschule in Viamao.

1960 trat ich in die Technische Landwirtschaftsschule in Viamao ein und erhielt dort 1962 mit dem Diplom als Landwirtschaftstechniker die Hochschulreife.

Von 1963 bis 1966 studierte ich an der Landwirtschaftlichen und Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität in Porto Alegre / Rio Grande do Sul / Brasilien Tiermedizin und erhielt dort am 14. 12. 1966 die Bestallung als Tierarzt.

Seit Januar 1967 arbeite ich im Staatlichen Veterinärmedizinischen Forschungsinstitut "Desidério Finamor" in Guaíba Brasilien.

Am 30. 12. 1971 kam ich als Stipendiat der Deutschen Stiftung für Entwicklungsländer in die Bundesrepublik Deutschland, besuchte bis 30. 4. 1972 das Goethe-Institut in Ebersberg und arbeite seit 1. 5. 1972 am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Seit 1966 bin ich mit Maria Salete Martins Vidor verheiratet.

Wir haben 2 Kinder

Herrn Professor Dr. A. Mayr danke ich sehr herzlich für die stets gern gewährte, großzügige Förderung, die die Erstellung der Dissertation ermöglicht hat.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dozent Dr. G. Wизigmann für seine verständnisvolle Anleitung und hilfreiche Unterstützung.

Die gewissenhafte technische Assistenz von Frau B. Haas möchte ich ebenfalls dankend hervorheben.

